

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTICÁNCER
DE *Thevetia peruviana*”**

POR

JOSÉ ALBERTO RAMOS SILVA

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA**

JULIO, 2018

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA



“Evaluación de la actividad anticáncer de *Thevetia peruviana*”

Por

José Alberto Ramos Silva

**Como requisito parcial para obtener el grado de
Doctor en Ciencias con Orientación en Biotecnología**

Julio, 2018

“Evaluación de la actividad anticáncer de *Thevetia peruviana*”.

Comité de tesis

Presidente: Dr. Hamlet Avilés Arnaut

Secretaria: Dra. Susana de la Torre Zavala

Vocal 1: Dra. Katiushka Arévalo Niño

Vocal 2: Dr. Benito Pereyra Alférez

Vocal 3: Dra. Aida Rodríguez García

“Evaluación de la actividad anticáncer de *Thevetia peruviana*”

Dirección de tesis

Director: Dr. Hamlet Avilés Arnaut

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Hamlet Avilés Arnaut por permite formar parte de su equipo de investigación, así como, por su apoyo, consejo y asesoría por lo cual fue posible llevar acabo este trabajo de investigación.

A mis compañeros en general del laboratorio 9 del instituto de biotecnología por todo el apoyo que me han dado y el agradable ambiente de trabajo que se tiene en el laboratorio.

A Cristal por ayudarme y enseñarme a iniciar mis experimentos en células.

A Faviola por aconsejarme mucho acerca del doctorado y la vida como investigador, ayudarme con múltiples experimentos y la escritura del artículo.

A la Dra. Mariana Elizondo y a Álvaro Colin del departamento de microbiología de la Facultad de Medicina por permitirnos utilizar su microscopio de fluorescencia.

A la Dra. Marion Brunck y a David Choy del Centro de Biotecnologia FEMSA en el Tecnologico de Monterrey por apoyarnos con su microscopio de fluorescencia.

A mis padres por su apoyo incondicional.

Y a CONACyT por brindar el apoyo económico con la beca de doctorado 388785.

DEDICATORIAS

A mis padres que siempre me han apoyado incondicionalmente.

ÍNDICE

Índice.....	V
Índice de tablas.....	IX
Índice de figuras.....	X
Lista de símbolos y abreviaciones.....	XII
Resumen.....	XIII
Abstract.....	XIV
1.Introducción.....	1
2. Antecedentes.....	3
2.1 Generalidades del cáncer.....	3
2.2 Tumores benignos.....	3
2.3 Tumores malignos.....	4
2.4 Características de las células de cáncer.....	4
2.4.1 Evasión de la respuesta apoptótica.....	5
2.4.2 Inmortalidad biológica.....	7
2.4.3 Metástasis.....	7
2.4.3.1 Invasión.....	8
2.5 Causas del cáncer.....	10
2.6 Epidemiología.....	12
2.7 Síntomas.....	13
2.8 Tratamiento.....	14
2.8.1 Quimioterapia.....	14
2.8.1.1 Agentes alquilantes.....	15

2.8.1.2 Inhibidores de topoisomerasas.....	16
2.8.1.3 Antimetabolitos.....	17
2.8.1.4 Inhibidores de microtúbulos.....	18
2.8.1.5 Antibióticos citotóxicos.....	18
2.8.1.6 Otros quimioterapéuticos.....	19
2.9 Productos vegetales como Anticancerígenos.....	20
2.10 Cardenólidos y glicósidos cardiacos.....	22
2.11 Familia Apocynaceae.....	24
3. Justificación.....	28
4. Hipótesis.....	29
5. Objetivo del trabajo.....	30
6. Materiales y métodos.....	31
6.1 Material biológico.....	31
6.2 Extracción y preparación de muestras.....	31
6.3 Líneas celulares y cultivo celular.....	31
6.3.1 Tripsinización.....	32
6.3.2 Conteo de células y viabilidad celular por azul tripán.....	32
6.3.3 Criopreservación.....	33
6.3.4 Descongelación.....	34
6.4 Ensayo de citotoxicidad.....	36
6.5 Ensayo clonogénico.....	37
6.6 Ensayo “Wound and Healing”.....	37
6.7 Ensayos de morfología celular y permeabilidad de membrana.....	38

6.8 Análisis de fragmentación del ADN.....	38
6.9 Tinción dual fluorescente con Bromuro de Etidio/Naranja de Acridina (BE/NA).....	39
6.10 Cromatografía de líquidos y análisis de espectrometría de masas.....	40
6.11 Ensayo de invasión transwell.....	41
6.12 Ensayo de sinergia.....	41
6.13 Análisis estadístico de datos.....	42
7. Resultados.....	43
7.1 Escrutinio.....	43
6.2 Actividad citotóxica del extracto metanólico del fruto de <i>T. peruviana</i> en las células de cáncer de próstata, mama, colon y pulmón.....	48
6.3 El extracto de <i>T. peruviana</i> inhibe la habilidad proliferativa.....	49
6.4 El extracto de <i>T. peruviana</i> afecta la motilidad celular.....	51
6.5 Cambios morfológicos.....	56
6.6 El extracto de <i>T. peruviana</i> afecta la viabilidad en forma tiempo-dependiente..	58
6.7 La motilidad y la permeabilidad de membrana son las principales características afectadas por el extracto de <i>T. peruviana</i>	60
6.8 El extracto de <i>T. peruviana</i> induce la fragmentación del ADN.....	63
6.9 El extracto de <i>T. peruviana</i> induce apoptosis en las células de cáncer de pulmón y próstata.....	64
6.10 Identificación de metabolitos de <i>T. peruviana</i> por análisis de LC-MS con potencial anticáncer.....	66
6.11 Actividad citotóxica de neriifósido y peruvósido.....	72

6.12 Neriifósido y peruvósido inhiben habilidad proliferativa de la línea de cáncer de próstata.....	73
6.13 Neriifósido y peruvósido inhiben la capacidad de invasión de la línea celular de cáncer de próstata.....	74
6.14 Neriifósido presenta sinergia con taxol y peruvósido en las líneas de cáncer de próstata y leucemia.....	75
6.15 Neriifósido y peruvósido causan cambios morfológicos de la línea de cáncer de próstata y leucemia linfocítica.....	77
6.16 Neriifósido y peruvósido inducen la muerte celular por apoptosis.....	82
8. Discusión.....	82
9. Conclusiones.....	90
10. Perspectivas.....	91
11. Bibliografía.....	92
12. Resumen Biográfico.....	107

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Listado de líneas celulares y condiciones de cultivo.....	35
Tabla 2. Plantas y partes de plantas que se usaron para el ensayo de citotoxicidad in vitro contra la línea de cáncer de colon HTB-38.....	43
Tabla 3. Valores de CI ₅₀ para los extractos metanólicos de los extractos seleccionados en la línea de cáncer de colon HTB-38.....	47
Tabla 4. Valores de CI ₅₀ para el extracto metanólico del fruto de <i>T. peruviana</i> en las líneas de cáncer de próstata, mama, colon y pulmón.....	48
Tabla 5. Viabilidad celular de las fracciones del extracto de <i>T. peruviana</i> en la línea celular de cáncer de próstata (HTB-81).....	68
Tabla 6. Viabilidad celular de las subfracciones de la fracción 5 del extracto de <i>T. peruviana</i> en la línea celular de cáncer de próstata (HTB-81).....	69
Tabla 7. Valores de CI ₅₀ del peruvósido y neriifósido aislados del extracto de <i>T. peruviana</i> sobre líneas de cáncer.....	72
Tabla 8. Índices combinatorios del peruvósido, neriifósido y taxol sobre líneas de cáncer de próstata y leucemia linfocítica.....	77

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Características principales del cáncer.....	5
Figura 2. Proceso de metástasis.....	8
Figura 3. Estadístico de incidencia de cáncer a nivel mundial.....	12
Figura 4. Fotografía <i>Thevetia peruviana</i>	27
Figura 5. Ensayo clonogénico (<i>T. peruviana</i>).....	50
Figura 6. Ensayo clonogénico (Doxorrubicina).....	51
Figura 7. Ensayo “Wound and healing” (<i>T. peruviana</i>).....	52
Figura 8. Ensayo “Wound and healing” (Doxorrubicina).....	54
Figura 9. Ensayo “Wound and healing” (graficas).....	55
Figura 10. Cambios morfológicos (<i>T. peruviana</i>).....	57
Figura 11. Cambios morfológicos (Doxorrubicina).....	58
Figura 12. Permeabilidad de membrana.....	59
Figura 13. Componentes independientes I y II.....	61
Figura 14. Componentes independientes I y III.....	62
Figura 15. Fragmentación de ADN.....	63
Figura 16. Tinción BE/NA (<i>T. peruviana</i>).....	65
Figura 17. Cromatografía Flash (<i>T. peruviana</i>).....	67
Figura 18. Cromatografía Flash (Fracción 5).....	68
Figura 19. Espectrometría de masas (Fr5-4 y Fr5-7).....	70
Figura 20. Estructura química de neriifósido, peruvósido y cerberina.....	71
Figura 21. Ensayo clonogénico de neriifósido y peruvósido.....	73
Figura 22. Ensayo de invasión de neriifósido y peruvósido.....	75

Figura 23. Ensayo de sinergia.....	76
Figura 24. Cambios morfológicos de neriifósido y peruvósido en próstata.....	78
Figura 25. Cambios morfológicos de neriifósido y peruvósido en leucemia.....	79
Figura 26. Fragmentación de ADN de neriifósido y peruvósido en próstata.....	80
Figura 27. Tinción BE/NA de neriifósido y peruvósido.....	81

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

NA: Naranja de acridina

ATCC: American Type Culture Collection

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's medium

DMSO: Dimetil sulfoxide

BE: Bromuro de etidio

IC: Componente independiente

CI₅₀: Concentración inhibitoria media

ICA: Análisis de componentes independientes

MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio de bromuro

PBS: Buffer salino de fosfatos

PC: Componente principal

RPMI: Roswell Park Memorial Institute medium

RESUMEN

El cáncer es un problema mayor de salud alrededor del mundo, su morbilidad y mortalidad incrementa una vez que ha ocurrido metástasis. El uso de agentes nutraceuticos como una alternativa han sido sugeridos para la prevención y tratamiento de cáncer avanzado. El propósito de este estudio obtener un agente nutraceutico con actividad contra células de cáncer humano, *in vitro*. Se evaluó la actividad citotóxica de 48 extractos metanólicos. De 32 plantas evaluadas, el proveniente de *Thevetia peruviana* presentó una $CI_{50} < 20 \mu\text{g/ml}$, el mayor efecto citotóxico contra células de cáncer de colon, mama, próstata y pulmón. El efecto contra células normales de fibroblastos y Vero fue nulo y marginal, respectivamente. El extracto causó una reducción significativa de la motilidad celular y formación de colonias en todas las líneas celulares de cáncer evaluadas. Además, la examinación morfológica mostró una disminución en el tamaño celular, formación de pliegues en la membrana celular y desprendimiento de las células, comparados contra las líneas celulares de cáncer no tratadas. El extracto de *T. peruviana* indujo muerte celular por apoptosis, que fue confirmada por los ensayos de fragmentación de ADN y la tinción dual de BE/NA. Neriifósido y peruvósido fueron determinados como los compuestos activos más potentes del extracto crudo. Su actividad citotóxica fue evaluada en las líneas celulares humanas de cáncer de próstata, colon ovario, melanoma y leucemia; con la mayoría de los $CI_{50} < 100 \text{ ng/ml}$. El extracto *T. peruviana* y sus compuestos activos neriifósido y peruvósido, tienen un potencial como un producto anticáncer con efectos críticos en la proliferación, motilidad y adhesión de las células de cáncer humano, inducción de apoptosis en las líneas celulares de cáncer humano de próstata, pulmón y leucemia, con mínimos efectos sobre las líneas celulares no cancerosas.

ABSTRACT

Cancer is the major health problem around the world, its morbidity and mortality increased once the cancer has metastasized. The use of nutraceutical agents as an alternative healing has been suggested for the preventions and treatment of advanced cancer. The purpose of this study was to obtain a nutraceutical agent with activity against human cancer cell, *in vitro*. We evaluated the cytotoxic activity of 48 metanolic extracts. From 32 plants evaluated, the one from *T. peruviana* showed values of CI_{50} lower than 20 $\mu\text{g/ml}$, with a mayor cytotoxic effect on colorectal, breast, prostate and lung cancer cell lines. The effect against the normal cell lines human fibroblast and vero, were null and marginal respectively. The extract caused a significant reduction of cell motility and colony formation on all evaluated cancer cell lines. In addition, morphological examination displayed cell size reduction, membrane blebbing and detachment of cells, compared to non-treated cancer cell lines. The *T. peruviana* extract induced apoptotic cell death, which was confirmed by DNA fragmentation and AO/EB double staining. Neriifoside and peruvoside were determined as the active compounds and they showed identical properties as the extract. Their cytotoxicity was evaluated on human prostate, colorectal, ovary cancer, melanoma and leukemic cell lines; with most CI_{50} values lower than 100 ng/ml . *T. peruviana* extract and his active compounds neriifoside and peruvoside has potential as anti-cancer product with critical effects in the proliferation, motility, and adhesion of human cancer cells, and apoptosis induction in human prostate lung and leukemic cancer cell lines, with minimal effects on non-tumorigenic cell lines.

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer es una de las más importantes causas de muerte a nivel mundial. En el 2018 se llevan reportadas 9.8 millones de muertes y se espera un aumento alrededor de un 70% en las próximas dos décadas (WHO, 2018). En México, el cáncer es la tercera causa de muerte y se estima que cada año se detectan 128 mil casos nuevos. Se reconoce al cáncer como una acumulación de anomalías genéticas que alteran las características del crecimiento celular. Estas anomalías también causan alteraciones tanto morfológicas como funcionales, dando como resultado células con producciones anormales de proteínas, enzimas y hormonas. El cáncer es caracterizado por un crecimiento incontrolado e invasivo de células. La característica más peculiar de las células de cáncer es la habilidad de hacer metástasis a otros órganos específicos. Por ejemplo, el cáncer de colon y próstata hace metástasis al hígado y a los huesos, respectivamente; el cáncer de pulmón se disemina al cerebro, glándulas adrenales, hígado, y huesos (Deep y Agarwal, 2010). Para los más importantes adenocarcinomas, como colon, mama o pulmón; el tratamiento es apenas efectivo, debido a que la enfermedad metastásica responde solo transitoriamente a los tratamientos convencionales. (Liao et al., 2012).

Las terapias convencionales para el tratamiento del cáncer consisten en la resección quirúrgica, la radioterapia y la quimioterapia, las cuales han resultado eficaces en el tratamiento de muchos pacientes. No obstante, existen varios casos de pacientes para los cuales dichas terapias han sido ineficaces o bien, han generado resistencia hacia los fármacos utilizados. Debido a ello, en las últimas décadas se ha realizado una búsqueda de agentes terapéuticos que permitan la mejora, complemento o sustitución de los métodos convencionales. Por lo tanto, los científicos están utilizando nuevas alternativas en los intentos por encontrar nuevos compuestos y estrategias para el tratamiento de la enfermedad.

La lista de productos naturales terapéuticos contra el cáncer es muy amplia, siendo los siguientes los principales: alcaloides, antibióticos antitumorales de antraciclinas, camptotecinas, epotilonas, topofilitoxinas, Inhibidores de rapamicina mTOR (mammalian

Target of Rapamycin), taxanos, etc. Muchos de estos agentes fueron descubiertos en base a su actividad antitumoral en ensayos fenotípicos o por su eficacia en *in vivo*. La mayoría de los productos naturales biológicamente activos son metabolitos secundarios con estructuras complejas. En algunos casos el producto natural en sí mismo puede ser usado, pero en otros, estos deben de ser alterados por métodos químicos o biológicos para poder ser usados.

El metabolismo secundario de diversos organismos ha evolucionado en respuesta a los retos y necesidades que deben de solventar en el medio ambiente en el que viven. Dando como resultado, una asombrosa cantidad de productos que han sido descubiertos en diversos medios ambientes y dando la inquietud por investigar en nichos inexplorados. El éxito de la industria farmacéutica depende de la combinación de tecnologías complementarias, así como el descubrimiento de productos naturales, high-throughput screening (HTS), genómica, proteómica, metabolómica y biosíntesis combinatoria. Debido a que la diversidad química de los productos naturales está basada en la diversidad biológica y geográfica, el mundo entero es explorado por los investigadores en búsqueda de nuevos compuestos con posibles efectos terapéuticos. Los investigadores han tenido un fácil acceso a la vida terrestre que es de donde provienen la mayoría de los productos naturales con éxito farmacéutico. Del total de productos naturales conocidos se estima que alrededor del 50% de estos provienen de plantas.

Las plantas han sido una valiosa fuente de moléculas biológicamente activas desde la antigüedad. En ellas se han descubierto una gran cantidad de moléculas bioactivas con características analgésicas, antibióticas, antiarrítmicas, antineoplásicas y muchas más. Por lo que el objetivo de este estudio fue la evaluación de la actividad antitumoral presente en 48 extractos vegetales con reportes de toxicidad en estudios de etnobotánica.

2. ANTECEDENTES

2.1 Generalidades del cáncer

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, el cáncer se define como un proceso de crecimiento y diseminación incontrolado de células en cualquier parte del cuerpo (WHO, 2018). Este proceso de crecimiento descontrolado es debido a alteraciones en el material genético de las células afectadas, que alteran diversas funciones celulares como la capacidad de regular el ciclo celular, reparación de errores en el material genético y la regulación de la apoptosis. En consecuencia, de este crecimiento descontrolado se da la formación de masas de células cancerosas conocidas como tumores. Los tumores se dividen en dos tipos: benignos y malignos.

2.2 Tumores benignos

Los tumores benignos están localizados en una zona focal y típicamente se encuentran recubiertos por una capa externa de tejido conectivo que los encapsula, estos tipos de tumores carecen de la habilidad de invadir a tejidos vecinos y presentan un mayor grado de diferenciación que su contraparte maligna. Aunque estos tumores no tienen la capacidad de invadir a otros tejidos, aun a si son capaces de causar efectos negativos a la salud, debido a que la acumulación de masa puede comprimir y dañar nervios, reducir el flujo sanguíneo, necrosis tisular, e interferir con el funcionamiento de órganos. Los tumores benignos son nombrados a partir de las células o tejidos de los que se originaron, seguidos del sufijo -oma, sin embargo, existen algunos canceres que conservan la terminación -oma por razones históricas como melanoma y seminoma. Crecimientos de tumores benignos en tejidos endocrinos pueden llevar a la sobre producción de hormonas y provocar padecimientos secundarios, ejemplo de esto son el adenoma tiroideo que es una causa de hipertiroidismo, el adenoma adrenocortical puede producir enfermedades como el síndrome de Cushing, síndrome de Conn, virilización en mujeres y feminización en hombres; insulinoma que produce grandes cantidades de insulina provocando hipoglicemia y adenomas pituitarios que causan múltiples problemas hormonales (Grant

CS, 2005). Aunque los tumores benignos por si solos no presentan riesgo de muerte, estos pueden convertirse en malignos por un proceso conocido como progresión tumoral (Clark WH, 1991). Por lo que la acción más recomendable es la remoción quirúrgica del tumor.

2.3 Tumores malignos

Los tumores malignos que son formados por células cancerosas poseen características que ponen en riesgo la vida del individuo como son el crecimiento descontrolado y su capacidad de invadir otros órganos y tejidos.

Estos tumores se clasifican en las siguientes categorías, de acuerdo con el tipo de célula de origen y el origen del tumor:

Carcinoma: Originados de células epiteliales. Representan alrededor del 90% de los cánceres.

Sarcoma: Provenientes de células de tejido conectivo. Ejemplo: osteocitos, adipocitos, condrocitos, células gliales.

Mieloma: Originada de células plasmáticas de la médula ósea.

Leucemia: Constituida por células hematopoyéticas en la médula ósea.

Linfoma: Proveniente de las glándulas, nodos y órganos del sistema linfático.

Blastoma: Originada de células precursoras o tejido embrionario.

Los tumores cancerosos son nombrados por la raíz griega o latina del órgano o tejido de origen más el sufijo -carcinoma, -sarcoma o -blastoma.

2.4 Características de las células de cáncer

Las características principales que se encuentran alteradas en las células de cáncer son: crecimiento de manera descontrolada, auto promoción de su crecimiento, son insensibles a las señales de regulación del organismo, evaden la respuesta apoptótica, tienen inmortalidad biológica, inducen angiogénesis, evaden la respuesta inmune, reprograman

el metabolismo e invaden tejidos vecinos y distantes por medio de metástasis (Fig. 1) (Hanahan y Weinberg, 2011). Estas alteraciones se encuentran presentes en casi todos los tipos de tumores cancerosos y son los que permiten a las células de cáncer evadir los mecanismos naturales anticáncer del organismo.

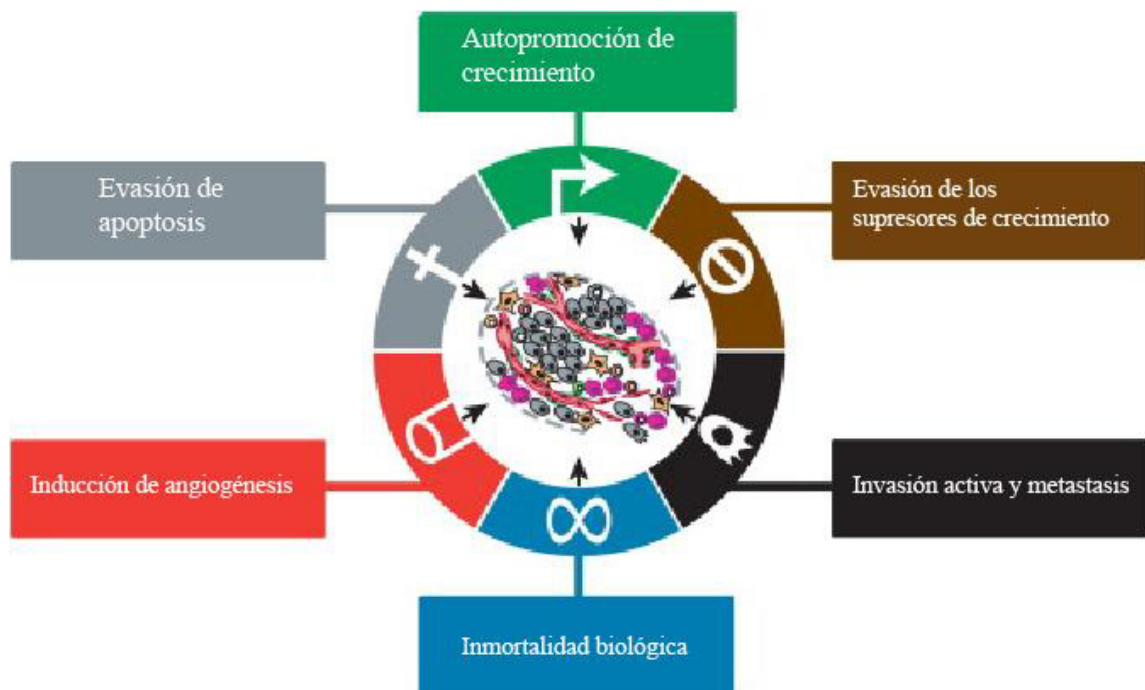


Figura 1. Características principales de los tumores malignos. Imagen modificada de Hanahan y Weinberg, 2011.

2.4.1 Evasión de la respuesta apoptótica.

La apoptosis o muerte celular programada es una vía de muerte celular en la cual el organismo se encarga de eliminar células dañadas y así mantener la homeostasis en el organismo. Otra característica de las células de cáncer es que tienen la capacidad de ignorar estas señales. Las señales apoptóticas están divididas en dos vías principales: la intrínseca y la extrínseca, las cuales pueden ser accionadas por moléculas que se unen a receptores de membrana. La vía extrínseca es activada por la unión de receptores de muerte (DR) con sus miembros específicos de la familia de factores de necrosis tumoral

como TNFR-1, Fas/CD95, y receptores TRAIL DR-4 and DR-5. Estas proteínas se unen al iniciador de las caspasas 8 y 10 formando el complejo de señalización inductor de muerte (DISC) (Lee et al., 2012). Seguida de la activación de las caspasas 8 y 10, el rompimiento de las caspasas 3, 6 y 7 que lleva finalmente a la fase final de la apoptosis: la degradación celular (Chowdhury et al., 2008). La vía intrínseca es inducida por diversos factores intracelulares como el estrés oxidativo, daño al ADN, hipoxia o la privación de factores de crecimiento que induce la permealización de la membrana externa de la mitocondria. La superfamilia Bcl-2 se encarga de regular la vía intrínseca y se divide en dos subcategorías: la proapoptótica y la antiapoptótica. Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1, A1 son proteínas antiapoptóticas actuando principalmente como inhibidores para las proteínas proapoptóticas Bax y Bak; que se encuentran entrelazadas en la membrana mitocondrial. Estas proteínas al ser activadas distúrbian la integridad de la membrana mitocondrial, ocasionando la liberación del citocromo c, el cual activa la cascada de caspasas que terminan desatando los eventos apoptóticos (Adams y Cory, 2007).

Las células de cáncer utilizan diversas estrategias para eludir la respuesta apoptótica. Las más comunes son: la pérdida de función de p53, la sobreexpresión de reguladores antiapoptosis o el silenciamiento o mutaciones en los reguladores proapoptosis.

Otro mecanismo ligado a la apoptosis es la autofagia. La autofagia le permite a la célula catabolizar organelos y otras moléculas propias con el fin de ser reciclados en situaciones de estrés por falta de nutrientes. La autofagia está interconectada con la apoptosis en diferentes vías, tales como su inhibición por señales de PI3-quinasa, AKT y mTOR; y que comparten a la proteína Beclin-1 como proteína reguladora. Por lo que, dependiendo del estado fisiológico de la célula, ésta puede inducir apoptosis o autofagia (Mukhopadhyay et al., 2014). Sin embargo, la autofagia parece ser un mecanismo que, promueve o impide la muerte de las células de cáncer (White y DiPaola, 2009). Ratones con alelos inactivos para beclin-1 mostraron tener susceptibilidad al cáncer, mientras que los elevados niveles de estrés producidos por la falta de nutrientes, radioterapias y tratamientos citotóxicos inducen altos niveles de autofagia, que hacen que estas células se encojan de tamaño y entren en un estado de hibernación reversible.

2.4.2 Inmortalidad biológica

La inmortalidad biológica es una de las características más aceptadas de las células tumorales, permitiéndoles tener un potencial replicativo ilimitado. La evidencia apunta que los telómeros que protegen los extremos de los cromosomas están implicados en esta capacidad. Los telómeros son regiones de hexanucleótidos repetidos en los extremos de los cromosomas, que van acortándose con cada replicación de las células hasta que eventualmente pierden su función y las células entran en estado de senescencia o apoptosis. Las telomerasas son DNA polimerasas especializadas en añadir segmentos repetidos de telómeros al DNA telomérico, permitiendo a las células que las sobreexpresan adquirir inmortalidad biológica, y se encuentran presentes en el 90% de las células inmortales (Blasco, 2005)

2.4.3 Metástasis

Otra característica principal del cáncer es su capacidad de migrar a diferentes partes del cuerpo y formar múltiples tumores secundarios. Este proceso es conocido como metástasis. La metástasis es un proceso complejo con múltiples pasos (Fig. 2) (Alizadeh et al., 2014).

Este puede dividirse en 5 pasos principales:

Disociación: Células del tumor se desprenden del tumor primario.

Invasión: Las células disociadas se infiltran entre el estroma circundante e invaden y migran a través del endotelio de los vasos sanguíneos o linfáticos.

Intravasación: Las células disociadas entran en circulación sanguínea o linfática después de haber cruzado exitosamente la matriz extracelular (ECM) y se diseminan a lugares distantes en el organismo.

Extravasación: Las células tumorales disociadas son distribuidas a través del torrente sanguíneo o linfático a órganos remotos.

Dormancia: Las células de cáncer invasoras pueden permanecer silenciadas por varios años.

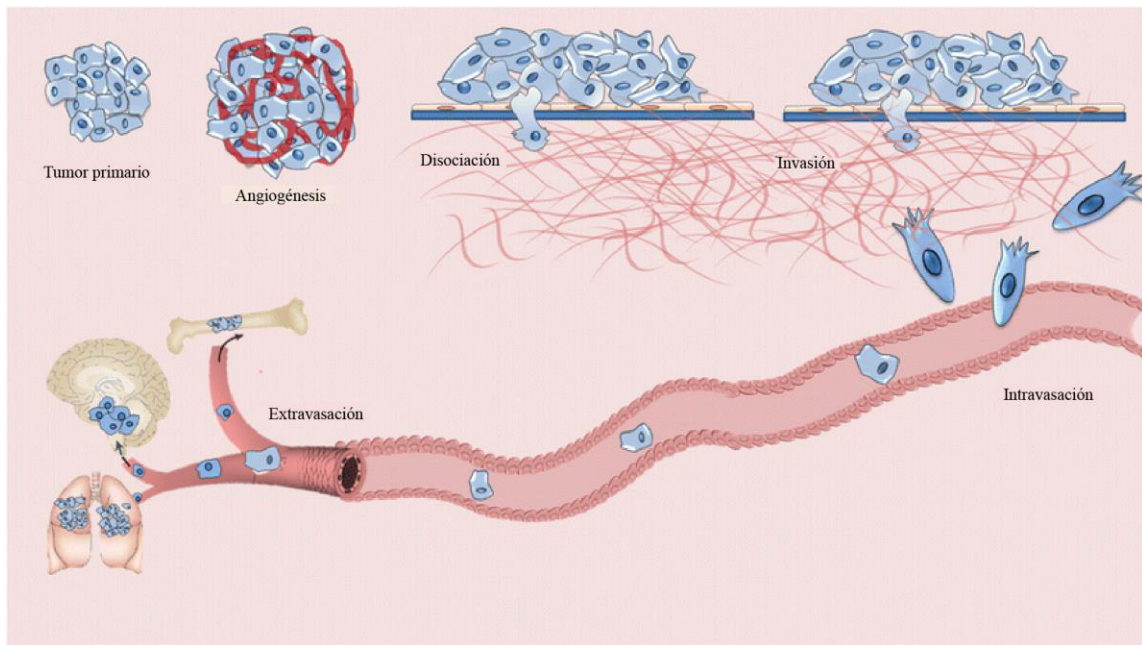


Figura 2. Pasos principales del proceso de metástasis. Estos pasos incluyen la disociación de una o varias células de cáncer del tumor principal, seguido del proceso de invasión a través de la matriz extracelular, después se diseminan por intravasación a través de la circulación sanguínea o linfática y finalmente migran fuera de los vasos por el proceso de extravasación e invaden órganos o tejidos remotos. Imagen modificada de Alizadeh et al., 2014.

2.4.3.1 Invasión

La invasión es el evento clave para la transición del crecimiento de un tumor local a uno sistémico, metastásico y una enfermedad que atenta contra la vida. Las células pueden comenzar su proceso de invasión de dos diferentes maneras: como células individuales, cuando las uniones célula-célula fallan o como grupos de células cuando las uniones célula-célula están presentes. Como células individuales emplean estrategias similares a fibroblastos o a leucocitos para pasar a través de la matriz extracelular. Como grupo de células pueden invadir formando monocapa, formando hilos de células o desprendiéndose colectivamente del tumor. El movimiento de grupos celulares es dependiente de integrinas que se conectan con proteínas de la matriz extracelular (Gray et al., 2010). Otro tipo de movimiento de invasión es el ameboideo, en el cual las células o grupos de células presentan uniones a la matriz extracelular débiles, hay una pérdida total de la polaridad celular y muestran capacidad de quimiotaxia. La motilidad ameboidea es independiente

de la acción de proteasas, al contrario de los demás tipos de movimientos de invasión, en el movimiento ameboideo las células se desplazan entre las fibras de la matriz, desplazándolas por fuerza mecánica en vez de degradarlas (Sabeih et al., 2009).

Las proteasas son enzimas especializadas en romper proteínas en puntos específicos que son utilizadas en un amplio repertorio de funciones fisiológicas. Su actividad proteolítica está asociada con la degradación de la matriz extracelular en los procesos metastásicos. Estas pueden ser clasificadas en 5 grupos: Proteasas de serina, cisteína, aspartato, treonina y metaloproteasas.

Las metaloproteasas son un grupo de endopeptidasas dependientes de zinc, capaces de degradar la membrana basal y la matriz extracelular. Se subdividen en 4 grupos: colagenasas, gelatinasas, estromelisin y matrilisin. MMP-2, es un tipo de gelatinasa capaz de degradar colágeno, fibronectina, y todos los componentes de la matriz extracelular. Se encuentra altamente involucrada en el remodelamiento de la matriz extracelular y es altamente expresada (Kamel et al., 2010). Aunque la mayoría de las funciones de las metaloproteasas promueven el desarrollo de cáncer, estas también poseen roles que inhiben la tumorigénesis. MMP-8 juega un papel protector en contra del cáncer, desencadenando la respuesta inflamatoria en presencia de carcinógenos. Se ha demostrado que la alteración en sus niveles de expresión altera el comportamiento metastásico en cáncer de mama (Gutiérrez-Fernández et al., 2008).

Las serinoproteasas son una de las familias de proteasas más conservadas. uPA es una serinoproteasa de la superficie celular involucrada en la degradación de la matriz extracelular, invasión y metástasis (Duffy et al., 1988). Adicionalmente, uPA puede desencadenar la activación de metaloproteasas, por lo que promueve la degradación de la matriz extracelular, la invasión y metástasis (Dass et al., 2008).

Las proteasas aspartáticas como la cathepsina-D, son enzimas lisosomales que son sintetizadas como su precursor que es activado en condiciones de pH ácidos. La sobreexpresión de cathepsina-D puede tener efectos degradativos sobre la matriz extracelular, pero también ha sido demostrado que la sobreexpresión de cathepsina-D estimula el crecimiento tumoral ya que degradan a los inhibidores de crecimiento, quimiocinas y atenúan la respuesta inmune antitumoral (Masson et al., 2010).

Las proteasas de cisteína, como las catepsinas de cisteína, son proteasas lisosomales sintetizadas como un precursor inactivo y son activadas por pH ácidos. Las catepsinas extracelulares contribuyen al proceso de degradación de la matriz extracelular degradando proteínas como la laminina, fibronectina, y colágeno tipo IV (Mohamed et al., 2006).

Las proteasas de treonina tienen la función de eliminar proteínas celulares a través de la adición de moléculas de ubiquitina. Estas proteasas se encuentran asociadas con un gran número de cánceres y han sido un blanco exitoso de inhibidores como el Bortezomib para el tratamiento del cáncer (Kane et al., 2007).

2.5 Causas del cáncer

Las alteraciones genéticas que terminan dando origen al cáncer pueden ser de carácter hereditario o adquiridas. Estas alteraciones surgen y se acumulan a lo largo de la vida del individuo afectado (Karp, 2011). Estas alteraciones adquiridas son causadas por diversos factores ambientales. Estos factores se pueden clasificar en: químicos, físicos y biológicos.

Los agentes químicos capaces de causar mutaciones y dañar el genoma son conocidos como carcinógenos. Existen en la actualidad una gran cantidad de compuestos clasificados como carcinógenos, algunos ejemplos incluyen a la familia de las dioxinas, 1,2-dibromoetano (EDB), hidrocarburos aromáticos, asbestos, etc. La exposición a agentes mutágenos como los residuos de nitrosaminas e hidrocarburos aromáticos en el humo del tabaco, no solo están asociados al cáncer de pulmón, sino también a los cánceres de laringe, esófago, vejiga, estomago, riñón y páncreas (Kuper et al., 2002). Así mismo, el consumo excesivo de alcohol también se encuentra asociado con algunos tipos de cánceres como el cáncer de hígado y de tracto digestivo (Boffetta et al., 2006).

Las causas físicas están principalmente relacionadas con la exposición a radiación. La radiación ionizante como la radiación UV está fuertemente relacionada con el desarrollo de melanomas. Los rayos X y radiación Gamma se encuentran asociados con leucemia y cáncer de tiroides. Radiaciones no ionizantes provenientes de radiofrecuencias de teléfonos celulares u otros equipos electrónicos han sido descritas como posibles

carcinógenos por la Agencia para Investigación del Cáncer de la Organización Mundial de la Salud; sin embargo, a la fecha no hay estudios concluyentes.

Los factores biológicos incluyen infecciones, dieta y actividad física, hormonas y enfermedades autoinmunes. Las infecciones virales del virus de papiloma humano están asociadas con cáncer cérvico-uterino, el virus del Epstein-barr con leucemias linfocíticas, el herpes virus humano 8, con el sarcoma de Kaposi, y los virus de hepatitis B y C con carcinoma hepatocelular. También las infecciones bacterianas y parasíticas conllevan al cáncer, como se observa en las infecciones por *Helicobacter pylori* y su incidencia con cáncer de estómago o infecciones parasitarias de *Schistosoma haematobium* y *Clonorchis sinensis*, que causan cáncer de vejiga e hígado respectivamente. Una mala alimentación acompañada de deficiente actividad física, puede contribuir al desarrollo del cáncer, promoviendo su crecimiento por un exceso de nutrientes, altas concentraciones de hormonas y sistemas inmunes deficientes (Thomson et al., 2014).

La mayoría de los cánceres se deben a factores ambientales, y en la mayoría de los casos, la combinación de diferentes factores de riesgo. Las familias con historial de cáncer, en la mayoría de los casos, son debidas a que comparten estilos de vida similares que terminan exponiéndolos a los mismos factores ambientales, y no a que carguen con un defecto genético que los predisponga al cáncer. Sin embargo, existe la posibilidad de que si carguen con algún gen mutado que los predisponga y sumado a factores ambientales terminen desencadenando la enfermedad. Según estudios epidemiológicos, solo del 5 al 10% de los cánceres son causados por causas hereditarias (Stadler et al., 2014). Un ejemplo de estos síndromes incluye a mutaciones en los genes BRCA1 y BRCA2, que fungen como supresores de tumores ayudando en la reparación de ADN dañado; estas mutaciones están asociadas con un 75% de riesgo a padecer cáncer de mama, ovario y cáncer colorrectal no asociado a poliposis (Síndrome de Lynch) (Friedenson, 2007).

2.6 Epidemiología

El cáncer es considerado como la segunda causa de muerte a nivel mundial, seguido solo por enfermedades cardiovasculares, y se estiman 9.6 millones de muertes a causa de cáncer en el 2018 (WHO, 2018). De acuerdo con estudios epidemiológicos, los cánceres más frecuentes en el 2018 a nivel mundial son: los cánceres de pulmón y mama liderando con 2.09 millones de casos, seguido del colorrectal con 1.8 millones de casos, cáncer de próstata con 1.28 millones de casos, cáncer de piel con 1.04 millones de casos, y cáncer de estómago con 1.03 millones de casos (Fig. 3). De estos, los cánceres con mayor mortalidad son el cáncer de pulmón con 1.76 millones de muertes atribuidas, colorrectales con 862,000 muertes, cáncer de estómago con 783,000 muertes, cáncer de hígado 782,000 muertes y cáncer de mama con 627,000 muertes.

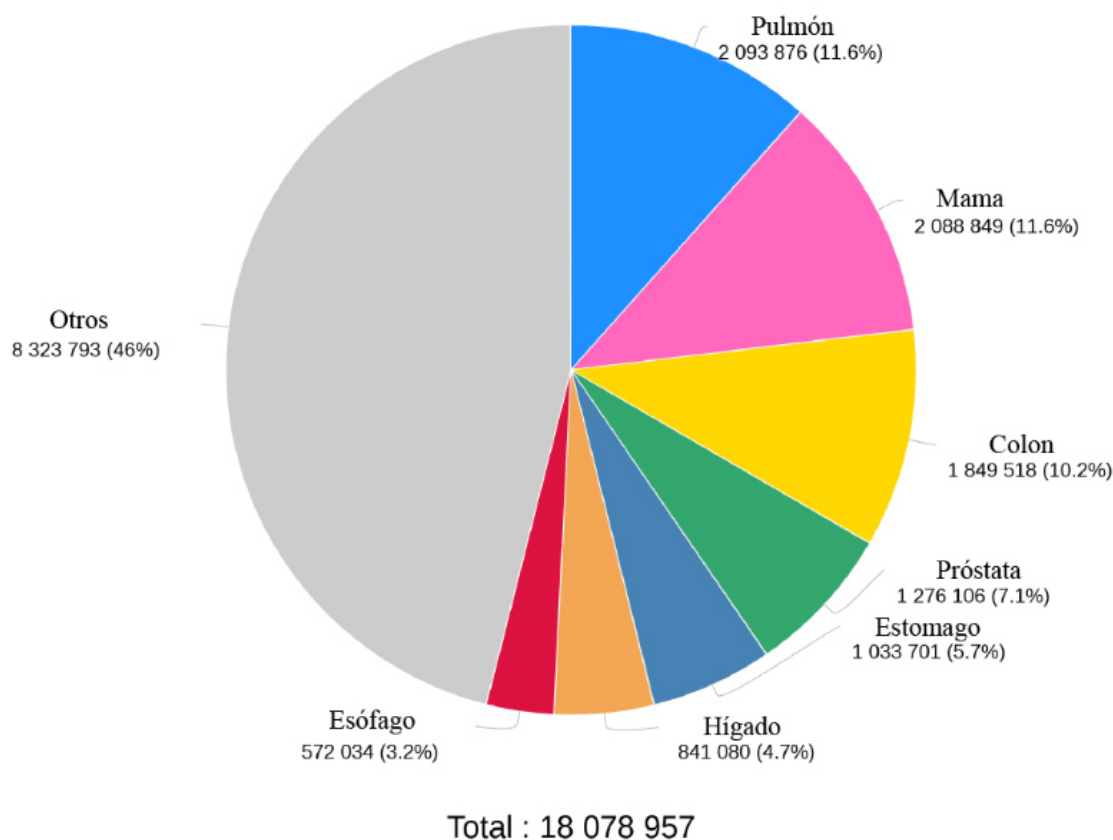


Figura 3. Numero estimado de casos para el 2018 de todos los tipos de cáncer a nivel mundial. Imagen modificada de GLOBOCAN 2018 <http://gco.iarc.fr>

En México, el cáncer es la tercera causa de muerte, seguida de la diabetes y enfermedades cardiovasculares. El Instituto Nacional de Estadística y Geográfica (INEGI) divide a la población en las siguientes divisiones, en niños y adolescentes (menores a 18 años), adultos (de 18 a 29), de 30 a 59 y mayores de 60.

Para menores de 18 años las incidencias principales de cáncer en el 2016 fueron los cánceres de origen hematopoyéticos (leucemias mieloides) con un 51.3% de los casos, cánceres del sistema nervioso con el 15%, cánceres de hueso y cartílagos con 7 % y cánceres de tejido linfático (leucemia linfocítica) con 4.9%.

En la población de 18 a 29 las incidencias en el 2016 fueron los cánceres hematopoyéticos con 28.3%, cánceres de carácter sexual (testículos y ovario) con 15.4%, cánceres de órganos digestivos con 12.6%, cánceres de tejido linfático con 8% y cánceres de sistema nervioso con 6.6%.

En poblaciones de 30 a 59 los cánceres de órganos digestivos con 29.4%, los cánceres de genitales femeninos con 16%, cáncer de mama con 14.2%, cánceres hematopoyéticos con 7.4% y cánceres del sistema respiratorio con 6.8%.

En la población de mayores de 60, las incidencias son: los cánceres de órganos digestivos con 35.5%, cánceres de genitales masculinos con 12.5%, cánceres del sistema respiratorio con 11.7%, órganos de genitales femeninos con 7.3% y cáncer de mama con 5.9%.

2.7 Síntomas

El cáncer en sus etapas tempranas es asintomático. Los síntomas comienzan a aparecer conforme la masa tumoral va creciendo e interfiere con las funciones de órganos o tejidos aledaños. Los síntomas son muy variados y están relacionados con la locación de la masa tumoral; por ejemplo, en el cáncer de pulmón, pueden causar dificultades para respirar, tos o neumonía; en los cánceres del sistema digestivo pueden incluir dificultad para tragar y bloqueo intestinal. Las ulceraciones son otro factor asociado con el crecimiento tumoral que pueden ocasionar sangrado interno, que puede llevar a toser sangre cuando ocurre en los pulmones, a sangrado rectal en cánceres colorrectales o sangre en la orina en cánceres renales. Otros síntomas generales incluyen pérdida inexplicable de peso, fiebre, fatiga

excesiva, cambios en la piel. Estos síntomas tan poco específicos son parte de la razón por lo que se suele diagnosticar incorrectamente al cáncer confundiéndolo con otras enfermedades y así permitiendo el avance de la enfermedad a fases más avanzadas.

2.8 Tratamiento

Los tratamientos contra el cáncer buscan, de manera directa e indirecta, detener el crecimiento y la diseminación de las células cancerosas. Los tratamientos principales incluyen la remoción quirúrgica, quimioterapia, radioterapia, inmunoterapia, hormonoterapia y terapias moleculares específicas.

La cirugía es uno de los métodos principales del tratamiento contra cáncer. Se usa en tumores sólidos que se encuentran aislados, y a menudo durante la remoción quirúrgica se retira una parte del tejido circundante al tumor, así como nódulos linfáticos. En etapas tempranas la remoción quirúrgica puede ser suficiente para eliminar el cáncer.

2.8.1 Quimioterapia

La quimioterapia es la estrategia de tratamiento anticáncer en el cual se usan una o varias drogas citotóxicas de manera sistémica con el fin de matar células cancerosas. La quimioterapia se suele usar en conjunto con otras terapias anticáncer. Uno de los principales problemas con las quimioterapias es su falta de especificidad contra las células cancerosas. Debido a que estos fármacos atacan a poblaciones celulares con altas tasas de proliferación, las principales poblaciones afectadas son las células epiteliales de la piel, tracto gastrointestinal, células sanguíneas y de la médula ósea. Los efectos adversos principales son: anemia, inmunosupresión, desórdenes gastrointestinales, náusea, vómito, fatiga, alopecia, infertilidad, formación de tumores secundarios, y el síndrome de lisis tumoral.

El síndrome de lisis tumoral es causado por la ruptura de un gran número de células de cáncer por necrosis, que ocasiona la liberación de sus contenidos al torrente sanguíneo y linfático; esto altera severamente la química sanguínea, causando altos niveles de potasio,

fósforo, ácido úrico, urea y compuestos de nitrógeno. Estos cambios pueden provocar múltiples fallas en riñón, hígado, corazón y sistema nervioso; y puede llevar a la muerte (Wilson y Berns, 2014).

La clasificación clásica de las drogas anticáncer incluye a: agentes alquilantes, inhibidores de topoisomerasas, antimetabolitos, inhibidores de microtúbulos, antibióticos citotóxicos y otros.

2.9.1.1 Agentes alquilantes

Los agentes alquilantes son drogas que reaccionan químicamente con las cadenas de ADN formando enlaces covalentes, llevando a la ruptura de la cadena o formando entrecruzamientos entre las cadenas. Originalmente derivados del gas mostaza usado durante la primera guerra mundial, estos fueron de los primeros compuestos que fueron identificados como útiles en el tratamiento contra el cáncer. Se dividen en diferentes familias: mostazas nitrogenadas, nitrosoureas y alquilsulfanatos.

Las mostazas nitrogenadas actúan formando iones cíclicos de amonio, estos anillos son atacados por el centro nucleofílico del N-7 de las guaninas, terminando alquilando el ADN. Algunos ejemplos de mostazas nitrogenadas son: melfalan, un derivado del 1-fenilalanina, se sabe que es transportado en las células por transporte activo y es particularmente efectivo en mielomas; y el clorambucil, que se usa para la enfermedad de Hodgkin y leucemias linfocíticas (Mattes et al., 1986).

La carmustina (BCNU), Iomustine (CCNU), semustine, fotemustine y estreptozotocina son ejemplos de nitrosoureas. Las nitrosoureas son de naturaleza altamente lipofílica, por lo que son ideales para el tratamiento de tumores cerebrales, ya que pueden atravesar la membrana hematoencefálica. Estos compuestos actúan alquilando a las guaninas en la posición 6 y formando entrecruzamientos entre las cadenas de ADN deteniendo todo proceso de replicación y transcripción (Erickson et al., 1980).

Busulfan es un alquilsulfonato que forma entrecruzamientos por medio de alquilación entre guanina-guanina y guanina-adenina. Este se usa como agente condicionante para el trasplante de médula en pacientes con leucemia (Rambaldi et al., 2015).

Los agentes alquilantes tienen funcionalidad limitada en presencia de enzima reparadora de ADN metil guanina metil transferasa (MGMT), ya que esta enzima es capaz de inhibir a los agentes alquilantes (Christmann et al., 2011).

Otro grupo de drogas que actúan de manera muy similar a los agentes alquilantes son los compuestos basados en platino. Igual que los agentes alquilantes, estos compuestos causan un entrecruzamiento entre las cadenas de ADN y logran esto atacando a la posición N-7 de las guaninas (Rudd et al., 1995). Algunos ejemplos de estas drogas son: cisplatino, carboplatino, dicicloplatino y oxaliplatino.

2.8.1.2 Inhibidores de topoisomerasas

Los inhibidores de la topoisomerasa son compuestos químicos que bloquean la acción de las topoisomerasas, que son enzimas responsables del desenrollamiento y enrollamiento del ADN, procesos necesarios para la replicación y transcripción. La topoisomera I actúa cortando una sola cadena de ADN, lo que permite que la otra cadena pase por el hueco creado para después cerrar el hueco y esto permite liberar el estrés generado por la torsión. La topoisomerasa II corta ambas cadenas de ADN, permitiendo que otra doble cadena de ADN pase por el hueco para después cerrarlo y lo ayuda a relajar el superenrollamiento de las cadenas.

Los inhibidores de topoisomerasas se dividen dependiendo de cuál topoisomerasa bloquean. Los inhibidores de la topoisomerasa I actúan estabilizando el complejo de corte y previniendo el religamiento de la cadena cortada, por lo tanto, deteniendo los procesos de replicación y transcripción (Pommier, 2006). Algunos ejemplos incluyen la camptotecina, irinotecan y topotecan. Los inhibidores de la topoisomerasa II se dividen por su mecanismo de acción en dos grupos: los que estabilizan el complejo de corte y mantienen la doble cadena cortada, lo que culmina en apoptosis. Etopósido, doxorubicina, mitoxantrona y tenipósido, son algunos ejemplos de drogas con este mecanismo. Los que bloquean la actividad de la topoisomerasa, por lo que previenen la replicación y transcripción debido a que las cadenas de ADN no pueden desenrollarse (Nitiss, 2009): novobiocina, merbarona y aclarubicina son ejemplos de este grupo.

2.8.1.3 Antimetabolitos

Los antimetabolitos son agentes citotóxicos que inhiben la síntesis de ADN, ya sea inhibiendo enzimas claves para la síntesis de ADN o incorporándose al ADN sustituyendo comúnmente a bases nitrogenadas por su similitud en estructura. Debido a que actúan sobre la síntesis de ADN, los antimetabolitos solo son activos durante la fase S del ciclo celular (Woolley, 2013). Existen múltiples mecanismos de acción por los cuales los antimetabolitos pueden interrumpir la síntesis de ADN, estos son agrupados de acuerdo al tipo de metabolito que terminan bloqueando al final de su mecanismo, los grupos comunes son:

Los antifolatos, que intervienen con la síntesis de ácido fólico. El antifolato más utilizado es el metotrexato, que tiene una estructura similar al ácido fólico, este inhibe a la dihidrofolato reductasa, evitando su oxidación a tetrahidrofolato, el cual actúa como cofactor para enzimas involucradas en la síntesis de timidilatos y purinas (Jolivet et al., 1983).

Las antipirimidinas, intervienen con la síntesis de uracilo, timina y citocina. El 5-fluorouracilo es un ejemplo de este grupo y es un derivado del uracilo que actúa tanto incorporándose al ARN bloqueando la transcripción, como formando un complejo covalente con la timidilato sintetasa, previniendo la síntesis de timina (Longley et al., 2003). La gemcitabina es otro ejemplo de antipirimidinas, que es capaz de integrarse al ADN durante la replicación sustituyendo a las citocinas, lo cual detiene futuras replications, ya que la DNA polimerasa no puede reconocerla como una base y finalmente lleva a la activación de apoptosis (Plunkett et al., 1995).

Las antipurinas, que antagonizan la síntesis de adenina y guanina. Existen dos drogas de este tipo en uso clínico. La 6-mercaptopurina y 6-tioguanina, actúan inhibiendo la enzima fosforribosil pirofosfato amidotransferasa, que es esencial para la síntesis de purinas (Nelson et al., 1975; Karimi-Maleh et al., 2016).

2.8.1.4 Inhibidores de microtúbulos

Los microtúbulos tienen varios papeles importantes, como formar parte de la estructura del citoesqueleto, participar en transporte intracelular, formar parte de cilios y flagelos; y ser los encargados de la separación de los cromosomas durante la mitosis. Los microtúbulos están conformados por subunidades de tubulina y son de estructura dinámica que requieren estar en constante proceso de ensamblaje y desensamblaje. Los inhibidores de microtúbulos actúan por dos principales mecanismos de acción: interviniendo con su ensamblaje o con su desensamblaje (Akhmanova y Steinmetz, 2015).

Los alcaloides de la vinca como la vincristina y vinblastina, son alcaloides vegetales extraídos originalmente de la vinca de Madagascar (*Catharanthus roseus*), que se unen a sitios específicos en las unidades de tubulina, impidiendo así su ensamblaje en microtúbulos. En contraste, los taxanos como paclitaxel y docetaxel son, compuestos originalmente extraídos del tejo del pacífico (*Taxus brevifolia*), actúan estabilizando las tubulinas en los microtúbulos, impidiendo su desensamblaje. Ambos mecanismos le impiden a la célula completar la mitosis y entran en un estado de arresto celular, que consecuentemente activa la muerte celular por apoptosis (Yue et al., 2010).

2.8.1.5 Antibióticos citotóxicos

Los antibióticos citotóxicos son un grupo muy variado de moléculas que pueden actuar tanto como antibióticos o como agentes citotóxicos. Funcionan utilizando los mecanismos de acción ya mencionados, como la inhibición de las topoisomerasas I y II; intercalación con el ADN, causando la ruptura de una o ambas cadenas y la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Los grupos más importantes son las antraciclinas y bleomicinas.

Las antraciclinas fueron primeramente obtenidas de la bacteria *Streptomyces peucetius*, doxorubicina y daunorrubicina fueron los primeros compuestos de este tipo en ser caracterizados. Ambos compuestos tienen un mecanismo de acción similar en el que inhiben a la topoisomerasa II. Algunos derivados de estos compuestos son epirubicina e idarubicina, que actúan por las tres vías de acción de las antraciclinas. Otras antraciclinas

de uso clínico incluyen a las pirarubicina, aclarubicina, y mitoxantrona (Minotti et al., 2004).

Las bleomicinas son glucopéptidos aislados de *Streptomyces verticillus*, que actúan intercalándose al ADN o ARN y producen especies reactivas de oxígeno que dañan al ADN y terminan por romperlo (Dorr, 1992).

2.8.1.6 Otros quimioterapéuticos

Muchos de los quimioterapéuticos que no se pueden agrupar en los grupos anteriores, pertenecen a los usados en las terapias molécula-dirigidas o terapias hormonales.

Las terapias hormonales involucran la manipulación del sistema endocrino a través de la administración de hormonas o antagonistas de las hormonas. Debido a que las hormonas juegan un papel importante en la regulación de expresión genética, ciertos tipos de cáncer son dependientes de ciertos niveles hormonales para poder desarrollarse, por lo que, al intervenir estos niveles, se puede detener su crecimiento o incluso llevarlos a muerte celular. Los principales cánceres susceptibles a la terapia hormonal son: cáncer de mama, próstata, ovario, endometrio, en la corteza adrenal y otras glándulas (Baselga et al., 2012; Grady et al., 1995; Gann et al., 1996). Los antagonistas de hormonas se dividen en dos tipos: los que inhiben la síntesis de hormonas y los que inhiben a los receptores de hormonas. Algunos ejemplos de fármacos antihormonales son: El tamoxifeno, es uno de los fármacos comúnmente recetado, es un modulador selectivo de receptores de estrógeno que inhibe a los receptores de estrógeno (Shiau et al., 1998). Letrozola y anastrozola son inhibidores de la aromatasa que bloquean la síntesis de estrógenos (Geisler et al., 2002). Leuprorelina es un análogo de la hormona liberadora de gonadotropina, que sobre estimulan a la pituitaria y está por retroalimentación negativa suprime la producción de todas las hormonas sexuales (Crighton et al., 1989; Sharifi et al., 1997). Flutamida que es un inhibidor de los receptores de andrógenos que evita el reconocimiento de la testosterona (Labrie, 1993).

Las terapias molécula-dirigidas se especializan en atacar moléculas específicas necesarias para el desarrollo tumoral. Estos compuestos blancos pueden ser proteínas, enzimas o

alteraciones genéticas específicas para las células cancerosas (Syn et al., 2016). Uno de los fármacos más exitoso de este grupo es el Gleevec, que es un inhibidor de quinasas con una fuerte afinidad a BCR-Abl, el cual es un potente estimulante de tumorigénesis en leucemias mielocíticas (Breedveld et al., 2005). La mayoría de los blancos de estas terapias son las tirosin-kinasas. Estas enzimas funcionan fosforilando proteínas específicas por medio de la adición de grupos ATP y esto sirve como un botón de prendido o apagado para muchas funciones celulares.

Otros inhibidores de tirosin-kinasas incluyen a erlotinib, bloquea el receptor del factor de crecimiento epidermal y es usado en cáncer de pulmón (Pao et al., 2004). Sunitinib, inhibe los receptores de múltiples tirosin-kinasas como el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas, el receptor del factor de crecimiento endotelial y CD117 (Chow y Eckhardt, 2007), por lo que inhibe la angiogénesis y la proliferación tumoral. Lapatinib, actúa inhibiendo el factor de crecimiento epidermal y HER2/neu, que es responsable de cánceres de mama de alta agresividad (Konecny et al., 2006).

2.9 Productos vegetales como Anticancerígenos

Alrededor de un millón de productos naturales son conocidos. El número de estos producidos por plantas es estimado entre 500,000 a 600,000 (Berdy, 1995; Mendelson y Balick 1995). Las estructuras de 160,000 productos naturales fueron elucidadas a finales de los 90s, con un valor en crecimiento de 10,000 por año (Henkel et al. 1999). De estos 100, de ellos son provenientes de plantas. Alrededor de 100,000 metabolitos secundarios de un peso molecular menor que 2,500 han sido caracterizados. Alrededor de la mitad de estos son producido por microorganismos y la otra mitad por plantas (Fenical y Jensen, 1993; Berdy, 1995).

Las plantas han sido una importante fuente de agentes anticancerosos aprobados (Dholwani et al. 2008). Los principales compuestos usados actualmente como drogas anti-cáncer en los Estados Unidos derivados de plantas son: Vinblastina (Velban), Vincristina (Oncovin), Etoposida, Teniposida, Taxol (Placitaxel), Navelbine (Vinorelbine), Taxoter

(Docetaxel), Camptotecina (Camptosar, Campto), Topotecan (Hycamtin) e Irinotecan (Bailly, 2009; Gordaliza, 2007; Kingston et al., 2012).

Los alcaloides monoterpenos indol de vinca, como la vinblastina y la vincristina, son originarias de la planta de vinca de Madagascar (*Catharanthus roseus*). La vinblastina es comúnmente usada para el tratamiento del linfoma de Hodgkin. Vincristina y vinblastina tienen importantes actividades farmacológicas, pero son desafiantes de sintetizar. La ingeniería metabólica de la biosíntesis de alcaloides puede proveer una ruta eficiente para la obtención de análogos farmacológicamente valiosos.

La camptotecina es un alcaloide de monoterpeno indol modificado producido por ciertas plantas (angiospermas) (Wall y Wani, 1996). La camptotecina es usada en contra de cáncer de colon recurrente y ha mostrado actividad contra cáncer de pulmón, ovario y útero (Amna et al., 2006).

El taxol (paclitaxel), un alcaloide de diterpeno, ha sido una molécula antitumoral muy exitosa. Fue descubierta originalmente en plantas, pero también ha sido encontrada en hongos (Stierle et al. 1993). Originalmente aislados de la corteza del Tejo del Pacífico (*Taxus brevifolia*), el taxol ha mostrado actividad antitumoral, pero tomó 6 árboles de 100 años de edad para tratar a un solo paciente (Horwitz, 1994). Hoy en día, el taxol es producido por cultivos de células vegetales o por semisíntesis de taxanos producidos por las especies *Taxus*. Entre estas especies se suman más de 350 compuestos conocidos como taxanos (Baloglu y Kingston, 1999).

El taxol ha tenido ventas de \$1.6 billones de dólares en el 2005. Está aprobado para el uso contra cáncer de seno y ovario y actúa por medio del bloqueo de la depolimerización de microtúbulos. Adicionalmente, el taxol promueve la polimerización de tubulina e inhibe la rápida división celular de las células cancerosas humanas (Manfredi y Horowitz, 1984). El taxol también tiene actividad antifúngica por el mismo mecanismo de microtúbulos especialmente contra oomicetos (Strobel y Long, 1998; Strobel, 2002).

La etoposida y la teniposida, derivados semisintéticos de la podofilotoxina, un antimetabolito de la raíz de la planta podofilo (*Podophyllum peltatum*) (Deorukhkar, 2007; Nobili et al., 2009), Actúan como inhibidores de la topoisomerasa II (Bender et al., 2008).

Etoposida ha sido aprobada para uso contra cáncer de pulmón, coriocarcinoma, cáncer de ovario y testicular, linfoma y leucemia mieloide aguda. La teniposida está probada para el tratamiento de tumores en el sistema nervioso central, linfoma maligno y cáncer de vejiga.

El pigmento de naftoquinona shikonin, es una medicina herbal, que es producida por el cultivo celular de la planta *Lithospermum erythrorhizon*, se usa principalmente como cosmético. De manera inesperada, shikonin y dos derivados fueron encontrados que inhiben el crecimiento del carcinoma de pulmón de Lewis en ratones (Lee et al., 2008). Otros productos vegetales como los isoflavonoides, indol-3-carbinol (I3C), 3-3'-diindolmetano, curcumin-epigallocatequina-3-galat, resveratrol y licopeno, se conoce que tienen la capacidad de inhibir el crecimiento tumoral y se encuentran en fase de estudios (Sarkar et al., 2009).

De acuerdo a la información reciente acerca de los agentes antitumorales aprobados desde 1930 hasta el 2012, el 16% de estos son productos naturales sin alteraciones, y el 31% son semisintéticos (Newman, 2013)

Debido al éxito que muchas de estas drogas han tenido en el mercado, muchos países retoman sus proyectos de bioprospección de sus plantas con el propósito de poder indagar en el descubrimiento de nuevos compuestos con actividad antitumoral. Con cerca de 500 nuevas drogas en proceso de investigación o en pre-proceso de investigación para convertirse en fármacos de origen botánico que están siendo considerados. Estos podrían convertirse en un futuro cercano en una nueva clasificación de fármacos. (Dou, 2013).

2.10 Cardenólidos y glucósidos cardíacos

Los glucósidos cardiotónicos son esteroides extraídos principalmente de plantas de las familias de las Plantaginaceae y Apocynaceae, pero también han sido encontrados en algunos anfibios como sapos marinos *Bufo marinus*. Estructuralmente se dividen en dos tipos. Los que constan de una estructura esteroidea que contienen un anillo 2-furanona lactona son conocidos como cardenólidos; y los que contienen un anillo 2-pirona lactona son conocidos como bufadienólidos; ambos tipos además contienen unidades de azúcares unidas. Muchos de los glucósidos cardiotónicos son usados para el tratamiento de

afecciones cardíacas como congestión y arritmias. Ejemplos de estos son digitoxina, digoxina, ouabaina y oleandrina, todos estos ya aprobados para el tratamiento de enfermedades cardíacas. Estas drogas actúan afectando la fuerza de la contracción cardíaca, a través de la inhibición específica de la bomba Na^+/K^+ -ATPasa, y provocando la acumulación Na^+ intracelular, que reduce la eficacia de la bomba $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ para expulsar Ca^{2+} , lo que causa una acumulación de Ca^{2+} intracelular, que incrementa la contractibilidad muscular (Schoner y Scheiner-Bobis, 2007).

En los últimos años se han estudiado los glucósidos cardiotónicos como un posibles agentes anticáncer. Estudios recientes con glucósidos cardiotónicos como digoxina, ouabaina y bufalina, han mostrado que actúan como potentes inhibidores de crecimiento de células de cáncer, y tienen la habilidad de bloquear el crecimiento de tumores humanos trasplantados a ratones (Zhang et al., 2008; Tailler et al., 2012; Wang et al., 2014). Sin embargo, un problema típico de estos compuestos es que sus dosis terapéuticas son cercanas a sus dosis tóxicas.

Actualmente no existen glucósidos cardiotónicos aprobados para su uso como agentes anticáncer. Sin embargo, múltiples de estos compuestos como digitoxina, digoxina, el glicósido cardiotónico semisintético UNBS1450 y dos extractos de *Nerium oleander*, se encuentran ya en fase de pruebas clínicas (Mijatovic y Kiss, 2013; Rashan et al., 2011; Calderón Montaña et al., 2013).

Diversos estudios han encontrado que los glucósidos cardiotónicos no inhiben la proliferación de las células de cáncer de manera selectiva. Se observó que la citotoxicidad de digitoxina, digoxina y ouabaina en las líneas celulares de cáncer de mama (MCF-7) y melanoma (UACC-62), fue similar a sus contrapartes no cancerosas MCF-10 y VH-10, respectivamente (Calderon-Montano et al., 2014). Otros estudios incluso han demostrado que ciertas células de cáncer de mama son más resistentes que las normales de mama en el tratamiento con ouabaina, dogoxina y bufalina (Clifford et al., 2013). Sin embargo, en otros estudios se ha observado que digoxina presenta una citotoxicidad selectiva contra células de leucemia linfoblástica (Hallböök et al., 2011).

El mecanismo principal de los glicósidos cardiotónicos es la inhibición de la bomba Na^+/K^+ -ATPasa, la cual es una enzima dependiente de ATP, encargada de mantener el

balance osmótico, por el intercambio de iones de Na^+ del interior de la célula por iones de K^+ . Los glucósidos cardiotónicos se unen a la bomba y bloquean la unión de ATP a la misma, deteniendo su función. Como consecuencia de la acumulación intracelular Na^+ , la bomba de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ pierde su capacidad de exportar Ca^{2+} fuera de la célula, lo que lleva a un incremento de la concentración de Ca^{2+} intracelular, que finalmente lleva a la activación de la respuesta apoptótica (Orrenius et al., 2003). Adicionalmente, en estudios recientes se ha observado que algunos glucósidos cardiotónicos pueden desencadenar muerte celular por autofagia en células de cáncer de mama, ovario y colon (Farah et al., 2016; Hsu et al., 2016; Kang et al., 2016). Y también la capacidad de desencadenar la muerte celular por el sistema inmune (Diederich et al., 2017). Estos últimos hallazgos revelan que aún no se conocen toda la extensión de los mecanismos por los que los glucósidos cardiotónicos causan la muerte celular.

2.11 Familia Apocynaceae

La familia Apocynaceae es una familia de plantas dicotiledóneas que incluye árboles, arbustos, hierbas y lianas. La mayoría de las especies de esta familia proceden de zonas tropicales y subtropicales. Muchos de sus integrantes producen un látex lechoso, rojizo o transparente; proveniente de lactíferos constituidos por células individuales.

En la antigüedad ciertas especies de la familia Apocynaceae han sido utilizadas como veneno (Woodson, 1930), como antiveneno para veneno de serpientes por algunas tribus de la india (*Nerium indicum* y *Rauvolfia serpentina*) y son ampliamente utilizadas como plantas ornamentales. En la medicina tradicional estas especies de plantas han sido usadas para tratar diversos malestares como fiebre, malaria, dolor, diabetes, enfermedades gastrointestinales y parasitarias.

Las especies de Apocynaceae son ricas en metabolitos como triterpenoides, iridoides, alkaloides y glucósidos cardiotónicos. Estos compuestos poseen una gran cantidad de actividades biológicas y farmacológicas como cardioprotector, hepatoprotector, neuroprotector, hipoglicemiante y antiinflamatorio (Omino *et al.* 1993). Diversas especies de la familia Apocynaceae han sido reportadas por tener una fuerte actividad citotóxica,

por lo que poseen una importante actividad anticáncer (Chan *et al.* 2016). Algunas de estas especies son: *Allamanda cathartica*, *Alstonia angustiloba*, *Calotropis gigantea*, *Catharanthus roseus*, *Cerbera odollam*, *Nerium oleander*, *Plumeria obtusa* y *Thevetia peruviana*.

Estudios sobre el extracto acuoso de *A. cathartica* demostraron que posee propiedades antileucemicas gracias a una lactona iridoide aislada del extracto, conocida como alamadina (Kupchan *et al.* 1974).

Los extractos de las hojas de *A. angustiloba* han demostrado poseer actividad anticáncer. Con CI_{50} (Concentración Inhibitoria media) reportadas de 20 ± 1.7 , 20 ± 1.1 y 16 ± 1.4 $\mu\text{g/ml}$ para las líneas MDA-MB-231, HeLa y HT-29 respectivamente (Wong *et al.* 2011).

Tres glucósidos cardiotónicos (calotropina, frugosida and 4'-O- β -D-glucopiranosil frugosida) aislados de la raíz de *C. gigantea*, mostraron tener actividad citotóxica sobre las células de cáncer KB, MCF-7 y NCI-H187 (Seeka *et al.* 2010).

El extracto metanólico de las hojas de *C. odollam* tiene una fuerte actividad inhibitoria contra las líneas MCF-7 y T47D con CI_{50} de 8.5 y 11 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente (Nurhanan *et al.* 2008). Se ha aislado un nuevo glucósido cardiotónico y tres compuestos conocidos (neriifolin 17 α , neriifolin 17 β y cerberina) de las semillas y raíz que fueron efectivos contra las líneas KB, BC y NCI-H187 (Cheenpracha *et al.* 2004).

Históricamente, *C. roseus* se ha usado para tratar una amplia variedad de enfermedades (Aslam *et al.* 2010). Decocciones de la planta entera son usadas para el tratamiento de malaria, diarrea, diabetes, enfermedades de la piel y cáncer. Extractos preparados de las hojas son usados como agentes antisépticos para la curación de heridas.

Drogas comerciales se han desarrollado a partir de los alcaloides aislados de *C. roseus* (vinblastina and vincristina) (Aslam *et al.* 2010). Sulfato de vinblastina (Velban) es usada para el tratamiento de la enfermedad de Hodgkin. Sulfato de vincristina (Oncovin) es efectiva para el tratamiento de leucemia aguda y leucemia linfocítica.

N. oleander es altamente venenosa y contiene compuestos tóxicos como oleandrina y neriosido. El extracto de *N. oleander* Anvirzel es promovido para el tratamiento de cáncer, SIDA y enfermedades cardíacas (Pathak *et al.* 2000).

Se han reportado diversos compuestos en la composición del extracto de *N. oleander* (Sharma *et al.* 2010). Los principales componentes incluyen: triterpenoides, pregnanas y cardenólidos. Extractos de las hojas y tallo han demostrado poseer una actividad citotóxica contra las líneas celulares de K-562, HL60, MCF-7, MDA-MB-231, HeLa, HT-29 y SKOV-3. Los triterpenos y cardenólidos asilados mostraron una mayor inhibición contra la línea celular MCF-7 con CI_{50} de 3.7 y 4.3 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente (Wong *et al.* 2011).

Se han identificado triterpenoides como componentes principales de las hojas de *P. obtusa* (Siddiqui *et al.* 1994). El extracto metanólico de la corteza es efectivo contra úlceras gástricas y el extracto hexanólico de las hojas tiene actividad anticáncer sobre las líneas MCF-7 y HeLa con CI_{50} de 5.7 y 10 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente (Wong *et al.* 2011).

Thevetia peruviana es un árbol que crece de 3 a 8 metros de altura (Fig. 4). Posee hojas lineales de ápice agudo con base cuneado-atenuada, de un color verde vivaz y están recubiertas por una cera para reducir la pérdida de agua. Florece durante el verano y otoño. Las flores son de color amarillo con forma de embudo. Los frutos son drupas carnosas redondeadas y con costillas; al madurar cambian del verde al negro, pasando por el rojo. Los frutos son potencialmente tóxicos y se utilizan desde hace ya cientos de años en la medicina china tradicional. Se cree que tiene propiedades curativas para quemar grasa, reducir triglicéridos y colesterol. El potencial anticáncer de las hojas, corteza y semillas de *T. peruviana* ha sido evaluado contra líneas celulares humanas de cáncer gástrico y pancreático (Tian *et al.*, 2016). El potencial anticáncer del fruto sigue siendo desconocido, porque solo unos cuantos glucósidos cardíacos han sido identificados y examinados como agentes citotóxicos.



Figura 4. Fotografía de *Thevetia peruviana*. Derechos de la fotografía atribuidos a Forest y Kim Starr, 2006

La familia Apocynaceae poseen una amplia variedad de propiedades farmacológicas, destacando principalmente su actividad antiproliferativa en contra de células de cáncer humanas. Esta actividad es debida a la presencia de compuestos tales como: alcaloides, cardenólidos, triterpenoides, iridoides, pregnanas y flavonoides. Sin embargo, aún no se conoce la fitoquímica de muchas especies de esta familia que podrían contener compuestos nuevos con actividades farmacológicas importantes.

3. JUSTIFICACIÓN

Una de las principales causas de muerte a nivel mundial es el cáncer. La OMS estima que solamente en el 2018, el número de muertes a causa de algún tipo de cáncer fue de 9.6 millones. De esta cifra, 2.9 millones es atribuible a cáncer de pulmón.

Los resultados del presente estudio podrían contribuir en la búsqueda de moléculas para terapias alternativas contra el cáncer, así como promover la utilización de la flora mexicana como fuentes de moléculas biológicas importantes.

4. HIPÓTESIS

Los extractos metanólicos obtenidos de las plantas mexicanas con estudios de etnobotánica colectadas poseen una importante actividad citotóxica en células tumorales humanas.

5. OBJETIVO DEL TRABAJO

1. Evaluar la actividad citotóxica de los extractos metanólicos de 38 plantas mexicanas con estudios etnobotánicos en la línea celular de cáncer de colon (HTB-38) y seleccionar los más activos.
2. Determinar la CI_{50} del extracto más activo en función de la potencia y la actividad diferencial sobre líneas tumorales y normales humanas.
3. Evaluar el efecto antimetastásico del extracto crudo.
4. Determinar el mecanismo de muerte celular del extracto crudo.
5. Separar e identificar los compuestos activos del extracto crudo.
6. Evaluar la toxicidad celular de los compuestos activos.
7. Evaluar el efecto antimetastásico de los compuestos activos
8. Determinar el mecanismo de muerte celular de los compuestos activos

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Material biológico.

Las plantas utilizadas para la elaboración de los extractos se obtuvieron de las locaciones mencionadas en la Tabla 2. La autenticación botánica del material fue realizada por el personal del departamento de botánica de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL.). Un espécimen de *Thevetia peruviana* fue depositado en el herbario de la Facultad de Ciencias Biológicas, UANL. (comprobante UNL-028732).

6.2 Extracción y preparación de muestras.

Los extractos de plantas fueron obtenidos de muestras (20g) de tallos, raíces, hojas o frutos secos a través de maceración con metanol (3 x 300 ml) a temperatura ambiente por 24 h y con agitación continua. Los extractos metanólicos fueron filtrados y evaporados bajo presión reducida usando un rotavapor (Yamato RE801). Las muestras fueron almacenadas a -20°C para su uso en experimentos futuros. Para los ensayos de citotoxicidad, el extracto metanólico seco fue disuelto en Dimetilsulfoxido (DMSO, Fisher Chemical, No. Cat. D128-1) para obtener una concentración final de 100 mg/ml y posteriormente diluirlo en buffer de fosfatos. La concentración de DMSO en el medio de cultivo fue menor al 0.1%.

6.3 Líneas celulares y cultivo celular.

Las líneas celulares de cáncer humanas usadas en este estudio fueron: adenocarcinoma colorrectal (HTB-38 y HTB-37, carcinoma pulmonar (HTB-177), adenocarcinoma prostático (HTB-81), leucemia linfoblástica (CRL-1582/MOLT 4), leucemia mielógena (CCL-243/K-562), melanoma (HTB-72), adenocarcinoma de ovario (HTB-161) y adenocarcinoma mamario (HTB-22); mientras que las líneas celulares normales usadas fueron fibroblastos de piel humanos (CCL-116) y epitelio de riñón de mono verde (células Vero CCL-81). Las líneas celulares fueron obtenidas de “American Type Culture Collection” (ATCC®). Las líneas celulares fueron cultivadas en medio DMEM

(Mediatech, Inc. No. cat. 10-013-CMR) o RPMI (Mediatech Inc. No. cat. 10-041-CMR) suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino (Byproducts, No. Cat. 90020) (Tabla 1). Todas las células fueron cultivadas a 37°C bajo una atmosfera humidificada conteniendo 5% de CO₂ (Infra[®], No. Cat. 431).

6.3.1 Tripsinización

Las células adherentes requieren de pasajes constantes para evitar que estas llenen por completo la superficie del recipiente que las contienen y así evitar la inhibición por contacto. Para esto las células fueron disgregadas de la monocapa por medio de tripsinización. En cultivos presentes en T-flask de 25 cm² (Corning[®] Costar[®], No. Cat. CLS3596) se procede a retirar el medio de cultivo, posteriormente las células se lavan con 2 ml de PBS 1X (Cellgro[®], No. Cat. 21-040-CV) y se agrega 1 ml de Tripsina EDTA, 1X (Cellgro[®], No. Cat. 25-051-CI). Se deja incubar por 13 min a 37 °C, al término del tiempo se golpea suavemente la base del T-flask para despegar las células que continúen adheridas y se utilizan 2 ml de medio fresco con 10% de SFB para lavar la superficie del T-flask, se relava la superficie del T-flask con este medio de 2 a 5 veces para así poder despegar la mayor cantidad de células de la superficie. Se toma todo el contenido del T-flask y se pasa a tubos de centrifuga de 15 ml (Corning[®], No. Cat. CLS430791), se centrifugan a 900 rpm por 6 min. Posterior a la centrifugación, se descarta el sobrenadante y se resuspenden las células en 1 ml de medio fresco. A partir de este paso las células pueden ser usadas para ensayos, lo cual requiere que sean contadas por el método de exclusión de azul tripán; o pueden ser pasadas a un T-flask nuevo y continuar con su cultivo.

6.3.2 Conteo de células y viabilidad celular por azul tripán

Previo a cada ensayo con células es necesario conocer la cantidad de células en cultivo, ya que todos los ensayos requieren del uso de un número determinado de células. Para esto se utilizó el método de exclusión de azul tripán (Strober, 2015). Para células adherentes es necesario realizar los pasos de tripsinización previamente, para las no

adherentes es necesario centrifugar el contenido del T-Flask a 900 rpm por 6 min, descartar el sobrenadante y resuspender en 1 ml de medio fresco. Teniendo esto, se toman 20 µl de la suspensión de células y se mezclan con 20 µl de azul tripán (0.4 %) (Hycl, No. Cat. 468) en tubos de microcentrífuga de 1.7 ml (Corning® Costar®, No. Cat. CLS3621), se toman 10 µl de la mezcla y se depositan en una cámara Neubauer (profundidad 0.1 mm, área 0.0025 mm²) (Marienfeld, No. Cat. 0640030). Se cuentan las células blancas (vivas) y azules (muertas) en los 4 cuadrantes de la cámara y se calcula la concentración de células con la siguiente formula: (# de células vivas/# de cuadrantes)x(volumen de la cuadrícula)x(factor de dilución)= # células vivas/ml; y la viabilidad celular por la fórmula: [(# de células vivas/(# de células vivas + # de células muertas))x100 = % de viabilidad. Todos los ensayos de células requieren un mínimo de 90% de viabilidad.

6.3.3 Criopreservación

La criopreservación de los cultivos de líneas celulares es un proceso necesario para mantener copias de las líneas en números pasajes bajos y tener un seguro en caso de imprevistos. El proceso de criopreservación para células adherentes sigue los mismos pasos que los del proceso de tripsinización hasta el punto de centrifugar, las células no adherentes se centrifugan directamente. La centrifugación se hace a 4°C a 900 rpm por 6 min, después las células se mantienen en hielo en todo momento. Posterior a la centrifugación, se decanta el sobrenadante y se resuspende en 4 ml de medio de congelación (75% medio, 20% SFB y 5% DMSO grado ultra puro (Amresco®, No. Cat. C999K06)). Después de resuspender se depositan 1 ml de la suspensión en crioviales de 2 ml (CryoTube™, No. Cat. 377224). Los crioviales se dejan congelar por 2 horas a -20 °C, después se pasan a -70 °C por toda la noche y finalmente se pasan a -150 °C donde pueden quedarse en criopreservación por una cantidad indeterminada de tiempo.

6.3.4 Descongelación

Se retira el criovial que se desee descongelar de $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se coloca en un baño metabólico a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 3 min, después se toma todo el contenido y se pasa a un T-flask con 4 ml de medio previamente calentado a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se deja incubar por una noche y al día siguiente se desecha el medio y se reemplaza por medio fresco. Esto con el fin de eliminar el DMSO que contenía el medio de congelación. Para las células no adherentes después de descongelar se pasan a un tubo de centrifuga de 15 ml con 2 ml de medio y se centrifugan a 900 rpm por 6 min; después se desecha el sobrenadante, se resuspenden en 5 ml de medio y se pasan a un T-flask de 25 cm^2 para su cultivo.

Tabla 1. Listado de líneas celulares y condiciones de cultivo.

Línea celular	Medio	# células/pozo para microplacas de 96 pozos	# células/pozo para “Wound and Healing”
Colon (HTB-38)	DMEM/10% SFB	6000	500000
Pulmón (HTB-177)	DMEM/10% SFB	5000	150000
Mama (HTB-22)	DMEM/10% SFB	4000	300000
Próstata (HTB-81)	RPMI/10% SFB	8000	200000
Vero	DMEM/10% SFB	6000	100000
Fibroblastos (Detroit-548)	DMEM/10% SFB	4000	200000
Colon (HTB-37)	DMEM/10% SFB	2000	200000
Ovario (HTB-161)	RPMI/10% SFB	30000	300000
Melanoma (HTB-72)	DMEM/10% SFB	3500	200000
Leucemia (Molt-4)	RPMI/10% SFB	80000	-
Leucemia (K562)	DMEM/10% SFB	20000	-

Lista de líneas celulares usadas, en la tabla se indica los medios de cultivo utilizados y la cantidad de células usadas para ensayos en placas de 96 pozos.

6.4 Ensayo de citotoxicidad.

Para el ensayo de citotoxicidad, se sembraron de acuerdo con la tabla 1 en placas de cultivo de tejidos de 96 pozos (Corning®, No. Cat. CLS3596). Cuando las células alcanzaron el 75% de confluencia, estas fueron incubadas con el extracto metanólico o los metabolitos purificados a diferentes concentraciones. Después de un período de incubación de 24 h, la citotoxicidad fue determinada usando el ensayo de MTT (Van Meerloo et al., 2011). Resumidamente, el ensayo de MTT toma 3 días para células adherentes y dos para las no adherentes. En el primer día se tripsinizan las células y se agregan en la cantidad adecuada de células para el ensayo (Tabla 1) en 200 µl de medio en microplacas de 96 pozos y se dejan adherir por la noche. En el segundo día, se cambia el medio por 200 µl medio fresco y se agregan 2 µl de los tratamientos para llegar a las concentraciones deseadas. Como blanco se usa 200 µl de medio, como control negativo se usa células sin tratamiento y se usa un control de cada control sin células. Se dejan en incubación a 37 °C y 5% CO₂ por 24 h. En el tercer día, se retiran el medio de cultivo y se sustituye por 100 µl de medio fresco, se añaden 10 µl de MTT (5 mg/ml) (BioBasic, No. Cat. T0793), se incuban por 4 h a 37 °C. Terminada la incubación se retira el medio y se agregan 100 µl de DMSO (Fisher, No. Cat. D128-1), se mezclan hasta lograr disolver los cristales de formazan y se lee a 570 nm. La concentración inhibitoria media (CI₅₀), los porcentajes de viabilidad celular y mortalidad fueron calculados de acuerdo con las siguientes ecuaciones (Eskandani et al., 2014): Viabilidad celular (%) = [(DO de las células tratadas – DO del blanco) / (DO de las células no tratadas – DO del blanco)] x 100. Mortalidad (%) = 100 – Viabilidad celular (%). Para la determinación de CI₅₀, se realizaron curvas de dosis-respuesta con 6 puntos, las concentraciones usadas en los puntos fueron determinadas experimentalmente para cada línea buscando que el 50% de mortalidad quedara dentro de la curva. Teniendo los % de mortalidad de las curvas se procedió a hacer un análisis de regresión no lineal de cuatro parámetros usando el software GraphPad Prims 7 para la determinación final del CI₅₀. Como control positivo se determinó también la CI₅₀ de doxorubicina (Zytokil®) y taxol (Ofoxel®). Todas las determinaciones fueron realizadas cinco veces de manera independiente con tres réplicas técnicas.

6.5 Ensayo clonogénico.

El ensayo clonogénico fue llevado a cabo de acuerdo a lo descrito en la literatura (Rafehi et al., 2011). Se incubaron de 100 células por pozo en microplacas de 6 pozos (Corning®, No. Cat. CLS3516) por 24 h a 37°C con 5% de CO₂ para permitir su adhesión. Las células fueron tratadas con sus correspondientes CI₅₀ por 24 h y fueron cultivadas por 7-14 días adicionales. Después los cultivos fueron teñidos directamente con cristal violeta al 0.5% por 30 min. Las colonias que contenían más de 50 células fueron fotografiadas y contadas usando el software ImageJ (Collins, 2007). Los resultados fueron expresados como número de colonias. Se realizaron tres experimentos independientes con tres réplicas técnicas cada uno.

6.6 Ensayo “Wound and Healing”.

El ensayo “Wound and Healing” fue llevado a cabo como se describe en la literatura (Liang et al., 2007). De acuerdo con la Tabla 1 las células fueron sembradas y crecidas por la noche hasta llegar al 100% de confluencia. Se realizó el raspado con una puntilla de 200 µl (Vertex, No Cat. 4220-06) desde la parte de arriba hasta abajo en un solo movimiento, posterior al raspado se retira el medio y es sustituido por 2 ml medio fresco, la monocapa fue tratada con los CI₅₀ correspondientes a cada línea celular por 24 h. Las células fueron migrando al área del raspado y fueron fotografiadas a 10X usando el microscopio invertido (Olympus IX71) (cámara Infinity 1-2, Lumera Corp., CA) cada 24 horas hasta el cierre de la herida en el control sin tratamiento. Las fotografías fueron analizadas con el software T-scrach, que identifica por medio de diferencia de contrastes el área de la herida y reporta el % de área de la herida (Gebäck et al., 2009) Se realizaron tres experimentos independientes con tres réplicas técnicas cada uno.

6.7 Ensayos de morfología celular y permeabilidad de membrana.

Las células fueron sembradas de acuerdo con la Tabla 1 en placas de 96 pozos por 24h. Después de la adhesión, las células fueron tratadas con el extracto a sus CI_{50} correspondientes por 4, 8, 16 y 24 h. Para la morfología celular, las células fueron observadas a 10X usando el microscopio invertido (Olympus IX71). Cada muestra fue observada bajo el microscopio y se tomaron fotografías inmediatamente después de la tinción. El ensayo de azul tripano fue usado para el ensayo de permeabilidad (0.4% azul tripan) (Strober, 2015). En el que se tiñeron las células con 50 μ l de azul tripan después de las 24 h de exposición a los tratamientos. Las células fueron fotografiadas a 10X y las fotografías analizadas con el software ImageJ, donde se contó el número de células vivas (células no tenidas) y el número de células muertas (células tenidas) y se determinó el % de viabilidad por la fórmula: $[(\# \text{ de células vivas}/(\# \text{ de células vivas} + \# \text{ de células muertas}))]\times 100 = \%$ de viabilidad. Como control negativo, las células fueron cultivadas en la misma placa sin el extracto; como control positivo se utilizó doxorubicina a su CI_{50} por 24 h. Se realizaron tres experimentos independientes con tres réplicas técnicas cada uno.

6.8 Análisis de fragmentación del ADN.

El ensayo de fragmentación de ADN fue llevado a cabo de acuerdo a lo descrito en la literatura (Lin et al., 2003). Las células fueron crecidas en T-flask presencia y ausencia del extracto crudo del fruto de *T. peruviana* o los compuestos activos, usando las CI_{50} correspondientes por 24 h. Células tratadas con Doxorubicina a su CI_{50} correspondiente fueron usadas como control positivo. Las células fueron tripsinizadas, después centrifugadas en tubos de microcentrífuga de 1.7 ml a 900 rpm por 6 min, el sobrenadante fue decantado y se procedió a extraer el ADN por el método de Fenol/Cloroformo. Aproximadamente, 5×10^5 células fueron lisadas en el buffer de lisis [1 M Tris-HCl (pH 8.0), 0.5 M EDTA, 100% Triton X-100, 2% SDS, 0.2 M NaCl], y mezclado con Fenol/Cloroformo/alcohol isoamimico (25/24/1). Después se vortexeo por 3 min, se calentó la muestra de células por 20 min a 65 °C y se sometió a un choque térmico a 4 °C por 5 min. Los tubos fueron centrifugados a 10000 rpm a 10 °C por 10 min, la fase acusa

fue tomada y pasada a un tubo nuevo y se les agrego 2.5 volúmenes de Etanol al 100% y 1/10 de Acetato de sodio (5 M a pH5.3). Se dejo precipitar toda la noche a -20 °C, después se centrifugo a 13000 rpm por 5 min, se decantó el sobrenadante y se lavó el pellet con etanol al 70%. Finalmente, se resuspendió en agua 20 µl estéril. La concentración y pureza de los ácidos nucleicos fue medida usando un espectrofotómetro NanoDrop ND-2000 (Thermo Scientific). Cantidades iguales de ADN (10 µg/pozo) fueron cargados en un gel de 1% de agarosa. Los fragmentos de ADN fueron visualizados usando un transiluminador UV (MultiDoc-it Digital Imaging System UVP). Se realizaron tres experimentos independientes con tres réplicas técnicas cada uno.

6.9 Tinción dual fluorescente con Bromuro de Etidio/Naranja de Acridina (BE/NA).

Para el método de BE/NA, se sembraron 5×10^5 células en una placa de 6 pozos y se dejaron reposar por una noche para asegurar su adherencia. Después, las células fueron tratadas con las CI_{50} correspondientes por 4 h. Las células fueron sometidas a la tinción BE/NA como se describe en la literatura (Cohen, 1993). Todas las células de cada pozo fueron tripsinizadas y resuspendidas en tubos de microcentrífuga con 25 µl buffer de fosfatos frío y después mezcladas con 2 µl del colorante BE/NA (100 µg/ml BE y 100 µg/ml NA: Sigma, No. Cat. E7637 y No. Cat. A6014). Inmediatamente la suspensión de células teñidas (10 µl) fueron vistas y contadas usando un microscopio invertido Nikon eclipse TS100 a 20x de magnificación con un filtro de excitación de 480/30 nm y un filtro de emisión de 535/40 nm. Las células vivas se representan como células teñidas de color verde uniforme, las células en fases de apoptosis temprana y tardía se caracterizaron por un núcleo verde o amarillo con forma de “cuentas de rosario” o un núcleo granular naranja y las células muertas por necrosis como células teñidas de color rojo. Se fotografiaron seis campos por muestra. Las fotografías fueron analizadas con el software ImageJ. Las células fueron contadas de acuerdo con su tinción diferencia como células vivas, en apoptosis temprana, tardía o apoptosis; los resultados se expresan como el porcentaje de células en cada estadio. Se realizaron tres repeticiones independientes.

6.10 Cromatografía de líquidos y análisis de espectrometría de masas.

El extracto metanólico de *T. peruviana* fue fraccionado por cromatografía en columna. Aproximadamente, 1.5 g del extracto del fruto fue absorbido en Celite 545 y sometido a cromatografía flash reversa en una columna C18 de 50 g RediSep Rf Gold HP, eluyendo con 10:90 de MeOH-H₂O por 4 CV. Después se aplicó un gradiente lineal desde 10:90 MeOH-H₂O hasta 100% de MeOH por 25 CV, manteniendo el 100% de MeOH por 8 CV, a una velocidad de flujo de 40 ml/min para dar 120 fracciones, cada una conteniendo 12 ml. Las fracciones resultantes fueron agrupadas de acuerdo con sus perfiles ELSD y UV, de las cuales resultaron en seis fracciones combinadas en total. Todas las fracciones fueron examinadas por UPLC-PDA-HRMS-MS/MS y probadas para determinar su actividad citotóxica contra la línea de cáncer de próstata humana (HTB-81) por el ensayo colorimétrico MTT. El mismo proceso se realizó para la obtención de subfracciones con actividad citotóxica que contenían compuestos puros.

Los datos de HRESIMS fueron colectados en los modos de ionización positivo y negativo usando un espectrofotómetro de masas Thermo QEactive Plus (ThermoFisher), equipado con una fuente electrospray de ionización (ESI) y vía un sistema Acquity UPLC (Waters Corp). La celda de disociación colisional de alta-energía utilizó 30 eV de energía para normalizar la colisión de todos los compuestos para obtener la información de MS/MS. La separación por UPLC fue realizada usando una columna Acquity BEH C18 equilibrada a 40°C y con una velocidad de flujo de 0.3 ml/min. La fase móvil consistió de 15% de CH₃CN por 0.5 minutos y posteriormente un gradiente lineal desde 15% de CH₃CN hasta al 100% CH₃CN por 6 min, y 1 min reteniendo 100% CH₃CN antes de regresar a las condiciones iniciales. Las muestras fueron disueltas en metanol grado MS y filtradas a través de un filtro de 0.2 µm Acrodisc (Waters). Una identificación tentativa fue realizada por comparación con los datos de HRMS, máxima UV y patrones de fragmentación (datos MS/MS) con los contenidos en el Diccionario de Productos Naturales para compuestos refinados de metabolitos de la planta *Thevetia*.

6.11 Ensayo de invasión transwell

El ensayo de invasión se realizó de acuerdo a lo descrito en la literatura (Valster et al., 2005; Justus et al., 2014), utilizando placas transwell(Corning® Costar® Transwell®, No. Cat. CLS3464), con membrana de PET de 6.5 mm de diámetro, con poros de 8 µm de diámetro. Un T-flask con células de cáncer de próstata en 70% de confluencia, fue sometido a 24 h de privación de suero fetal bovino con el fin de sensibilizar las células para mejorar la eficacia de la quimiotaxis, mientras que una alícuota de matrigel (Corning® Matrigel®, No. Cat. 356234) se descongela por la noche a 4°C. Primero se prepara la cámara interior agregando 70 µl de matrigel ajustado a una concentración de 2 mg/ml diluyendo la alícuota con medio de cultivo libre de suero, después se incuba por 2 h a 37 °C para permitir la gelificación. Posteriormente, se tripsinizan las células y se agregan 2×10^5 células en la cámara interior. En la cámara interior se agregan 200 µl de medio libre de suero junto con la CI_{50} de los compuestos y en la exterior 500 µl de medio con suero. Se incuban las células por 48 h, se descarta el medio de la cámara interior. Se utiliza un hisopo para remover los restos del matrigel, después se fijan las células a la membrana con etanol al 100% por 20 min y después se tiñen con cristal violeta al 0.5 % por 30 min. Se cuentan las células teñidas que lograron migrar a través del matrigel y los poros de la membrana tomando fotografías a 10X en el microscopio invertido. Las fotografías fueron analizadas con el software ImageJ, las células de cada membrana fueron contadas y los resultados se expresan como porcentaje de invasión relativa contra el control negativo de células sin tratamiento. Como control positivo se utilizó Taxol a su CI_{50} correspondiente. Se realizaron tres replicas con tres repeticiones.

6.12 Ensayo de sinergia

Estos ensayos fueron realizados de acuerdo al método Chou-Talalay (Chou, 2010). En el que se realizaron ensayos de citotoxicidad en la línea de cáncer de próstata HTB-81 y leucemia linfocítica Molt-4 por MTT, usando los CI_{50} de neriifósido, peruvósido y taxol individualmente. Luego se repitió el experimento usando 2 veces su CI_{50} y finalmente se usaron combinaciones de las CI_{50} de neriifósido-taxol, peruvósido-taxol y neriifósido-peruvósido; para determinar el índice combinatorio por el software CompuSyn (Chou y

Martin; 2007) (www.combosyn.com). Un índice combinatorio mayor a 1 indica antagonismo, un índice igual a uno indica efecto aditivo y un índice menor a uno indica sinergia.

6.13 Análisis estadístico de datos.

Los análisis estadísticos se realizaron usando el software GraphPad Prims 7. El valor de p fue analizado en comparación con las muestras no tratadas usando la prueba t-Student o usando análisis de varianza (ANOVA) seguida de por una prueba de Tukey para la comparación de medias de los diferentes grupos de tratamientos. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas a $p < 0.05$. Los resultados fueron expresados como la media \pm el error estándar de los datos obtenidos de triplicados o quintuplicados, de experimentos independientes. El análisis multivariado fue realizado usando el ambiente R 3.2.5. (R Core Team, 2013). R: A language and environment for statistical computing. [<https://www.R-project.org/>]. Tres réplicas biológicas por cada línea celular fueron evaluadas y las variables usadas fueron los CI_{50} , el ensayo clonogénico (CL), la permeabilidad celular (MP) y el ensayo “Wound and healing” (WH). Todas las variables fueron centradas y escaladas. Un análisis estandarizado de componentes principales (PCA) fue realizado con el paquete “ade4” (Dray y Dufour, 2007), seguido de un análisis de componentes independientes (ICA) aplicado a los patrones de PCA (Marchini et al., 2013) por medio del paquete “fastICA” (FastICA. FastICA Algorithms to perform ICA and Projection Pursuit. [<https://CRAN.R-project.org/package=fastICA>]), y los componentes individuales extraídos fueron categorizados usando la medición de kurtosis como criterio de evaluación. La carga de cada variable a un componente individual se obtuvo combinando la matriz de transformación de V del PCA con la matriz no combinada de W de ICA a una transformación directa $U = V * W$; los elementos del vector i th en U representan las contribuciones individuales al componente i th independiente (ICI).

7. RESULTADOS

7.1 Escrutinio

Cuarenta y ocho extractos metanólicos provenientes de treinta y nueve plantas fueron evaluados por su potencial como agentes citotóxicos Tabla 1. Inicialmente, la línea de cáncer de colon HTB-38 fue usada para monitorear la viabilidad en respuesta a una concentración de 1000 µg/ml. De estos, 23 extractos tuvieron una actividad mayor al compuesto antineoplásico doxorubicina en la línea celular de cáncer de colon (HTB-38) con porcentajes de viabilidad menores al 60% (Tabla 2). Se seleccionaron cuatro para la determinación de la CI₅₀. El criterio de selección fue que estos extractos tuvieran poca o ninguna información bibliográfica en cuanto a su actividad citotóxica y una potencia mayor a la doxorubicina. Los extractos seleccionados fueron de las plantas *Jatropha cinerea*, *Cyrtocarpa edulis*, *Rhododendrom nudiflorum* y *Thevetia peruviana*; y se determinó su CI₅₀ para la línea de cáncer de colon HTB-38 (Tabla 3). El extracto metanólico de *T. peruviana* demostró tener la CI₅₀ más baja de los cuatro de manera significativa, con 6.30±4.45 µg/ml, por lo que se decidió enfocar todos los recursos a su estudio.

Tabla 2. Plantas y partes de plantas que se usaron para el ensayo de citotoxicidad in vitro contra la línea de cáncer de colon HTB-38.

Familia	Especie	Autoridad Botánica	Parte(s) colectada(s)	Lugar de recolección	% Viabilidad †
Amaranthaceae	<i>Iresine herbstii</i>	P. Browne	Hojas	San Nicolás de los Garza, N.L.	65±11
Amaranthaceae	<i>Chenopodium ambrosioides</i>	Linnaeus	Hojas	San Nicolás de los Garza, N.L.	65±4.6

Amaranthaceae	<i>Tidestromia lanuginosa</i>	(Nutt.) Standl	Hojas / tallo	Cuatrociéne gas, Coah.	112±8
Amaryllidaceae	<i>Hippeastrum</i> sp.	Herbet	Hojas / tallo	Muestra comercial	88±18
Amaryllidaceae	<i>Hippeastrum</i> sp.	Herbet	Bulbo	Muestra comercial	59±11
Anacardiaceae	<i>Cyrtocarpa edulis</i>	(Brandeggee) Standl.	Tallo	El carrizal, B.C.S.	3.4±3
Anacardiaceae	<i>Cyrtocarpa edulis</i>	(Brandeggee) Standl.	Hojas	El carrizal, B.C.S.	46±12.16
Apocynaceae	<i>Nerium oleander</i>	Linnaeus	Hojas	San Nicolás de los Garza, N.L.	35.6±7
Apocynaceae	<i>Adenium obesum</i>	(Forssk.) Roem. y Schult.	Hojas / tallo	Muestra comercial	70.6±13
Apocynaceae	<i>Catharanthus roseus</i>	(L.) G. Don	Hojas / tallo	Muestra comercial	54±0.64
Apocynaceae	<i>Thevetia peruviana</i>	(Pers.) K. Schum.	Fruto	San Nicolás de los Garza, N.L.	50±7
Apocynaceae	<i>Asclepias subulata</i>	Decne.	Planta completa	Cuatrociéne gas, Coahuila.	30.6±19
Bignoniaceae	<i>Tecoma stans</i>	(L.) Juss. ex Kunth	Hojas	Monterrey, N.L.	93±19
Bignoniaceae	<i>Tecoma stans</i>	(L.) Juss. ex Kunth	Hojas / tallo	Monterrey, N.L.	62±11
Boraginaceae	<i>Nama stenophyllum</i>	Gray Ex Hemsl.	Hojas / tallo	Cuatrociéne gas, Coah.	102±16

Burseraceae	<i>Bursera microphylla</i>	Gray	Tallo	El carrizal, B.C.S.	11.8±1.5
Burseraceae	<i>Bursera microphylla</i>	Gray	Fruto	El carrizal, B.C.S.	15.8±5
Burseraceae	<i>Bursera microphylla</i>	Gray	Hojas	El carrizal, B.C.S.	47.6±23.9
Buxaceae	<i>Buxus sempervirens</i>	Linnaeus	Hojas	Monterrey, N.L.	3.5±1.23
Cactaceae	<i>Lophophora williamsii</i>	J. M. Coult.	Raíz	Real de Catorce, S.L.P.	140±20
Cactaceae	<i>Lophophora williamsii</i>	J. M. Coult.	Tallo	Real de Catorce, S.L.P.	86±4
Crassulaceae	<i>Kalanchoe sp.</i>	Adans.	Toda la planta	Muestra comercial	43.5±4.24
Cupressaceae	<i>Juniperus sp</i>	Linnaeus	Hojas	Monterrey, N.L.	3.3±3
Cupressaceae	<i>Thuja occidentalis</i>	Linnaeus	Hojas	Monterrey, N.L.	10.7±5.5
Cycadaceae	<i>Cycas revoluta</i>	Thunb	Hojas	San Nicolás de los Garza, N.L.	88±12
Dennstaedtiaceae	<i>Pteridium aquilinum</i>	(L.) Kuhn 1879	Hojas	Monterrey, N.L.	97±14
Dryopteridaceae	<i>Dryopteris filix-mas</i>	(L.) Schott	Hojas	Muestra comercial	53.7±10
Ericaceae	<i>Rhododendron nudiflorum</i>	Linnaeus	Hojas	Muestra comercial	133±9.6
Ericaceae	<i>Rhododendron nudiflorum</i>	Linnaeus	Hojas	Muestra comercial	23.2±7.8

Euphorbiaceae	<i>Jatropha dioica</i>	Sessé	Planta entera	Muestra comercial	54±8
Euphorbiaceae	<i>Jatropha cinérea</i>	Linnaeus	Hojas	Todos Santos, B.C.S.	91±4.6
Euphorbiaceae	<i>Ricinus comunis</i>	Linnaeus	Semillas	San Nicolás de los Garza, N.L.	139±18.6
Euphorbiaceae	<i>Jatropha cinérea</i>	Linnaeus	Tallo	Muestra comercial	15.5±8.41
Fabaceae	<i>Acacia greggii</i>	Gray	Hojas	El carrizal, B.C.S.	106±4
Fabaceae	<i>Sophora secundiflora</i>	Linnaeus	Semillas	Monterrey, N.L.	119±19.7
Meliaceae	<i>Melia azedarach</i>	Linnaeus	Fruto	La estanzuela, N.L.	78±15
Moraceae	<i>Ficus elastica</i>	Roxb. exHornem.	Hojas	Monterrey, N.L.	80±13
Papaveraceae	<i>Argemone mexicana</i>	Linnaeus	Hojas	San Nicolás de los Garza, N.L.	67±3
Petiveriaceae	<i>Rivina humilis</i>	Linnaeus	Fruto	Monterrey, N.L.	122±8
Rhamnaceae	<i>Karwinskia humboldtiana</i>	(Schult.) Zucc.	Fruto	Monterrey, N.L.	80±13
Rhamnaceae	<i>Karwinskia humboldtiana</i>	(Schult.) Zucc.	Hojas	Monterrey, N.L.	43.5±6.5
Rosaceae	<i>Eriobotrya japónica</i>	(Thunb.) Lindl.	Hojas	San Nicolás de los Garza, N.L.	30.2±5.75

Rutaceae	<i>Zanthoxylum fagara</i>	Linnaeus	Fruto	Monterrey, N.L.	6.2±3.5
Scrophulariaceae	<i>Leucophyllum frutescens</i>	(Berl.) I. M. Johnst.	Hojas / tallo	Cuatrociéne gas, Coah.	74±10
Solanaceae	<i>Nicotiana glauca</i>	Graham	Hojas	San Nicolás de los Garza, N.L.	106±12
Solanaceae	<i>Solanum elaeagnifolium</i>	Canavilles	Fruto	San Nicolás de los Garza, N.L.	105±8
Solanaceae	<i>Datura quercifolia</i>	Kunth	Semillas	San Nicolás de los Garza, N. L.	58±7
Solanaceae	<i>Nicotiana sp.</i>	Linnaeus	Hojas	San Nicolás de los Garza, N.L.	5.7±1.27

*Doxorubicina fue probada a 10 µg/mL con un % de viabilidad de 60%. †Los extractos metanólicos fueron probados a 1000µg/ml por 24 h.

Tabla 3. Valores de CI₅₀ para los extractos metanólicos de los extractos seleccionados en la línea de cáncer de colon HTB-38.

Extracto	CI ₅₀ (µg/ml)
<i>Cyrtocarpa edulis</i>	151.747 ± 8.417
<i>Rhododendrom nudiflorum</i>	337.686 ± 10.2743
<i>Jatropha cinérea</i>	563.541 ± 24.8638
<i>Thevetia peruviana</i>	6.30±4.45

La línea celular de cáncer de colon fue tratada con diferentes concentraciones de los extractos metanólicos en placas de 96 pozos por 24 h. Los valores de CI₅₀ se expresan como la media ± el error estándar de un quintuplicado.

6.2 Actividad citotóxica del extracto metanólico del fruto de *T. peruviana* en las células de cáncer de próstata, mama, colon y pulmón.

Con el propósito de evaluar el efecto citotóxico del extracto metanólico del fruto de *T. peruviana* en las líneas de cáncer de mama (HTB-22), colon (HTB-38), próstata (HTB-81) y pulmón (HTB-177), se realizó un ensayo de MTT. Los valores de la CI_{50} indican la concentración en la que el extracto inhibe el crecimiento del 50% de la población celular. El criterio de citotoxicidad establecido por el Instituto Nacional del Cáncer de E.U.A. (NCI), considera a un extracto crudo como activo, moderadamente activo, o inactivo, cuando el valor de CI_{50} es menor a 20 $\mu\text{g/ml}$, de 20 a 100 $\mu\text{g/ml}$, o más de 100 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente (Skehan et al., 1990). El extracto metanólico del fruto de *T. peruviana* indujo una fuerte citotoxicidad en las cuatro líneas celulares de cáncer ($<20 \mu\text{g/ml}$), pero la línea de cáncer de próstata fue la que mostró la menor CI_{50} después del tratamiento (CI_{50} , $1.91 \pm 0.76 \mu\text{g/ml}$); (Tabla 2). En contraste, el extracto exhibió moderada actividad en contra de células Vero y fue inactivo contra la línea de fibroblastos humanos (Tabla 4). De acuerdo a estos resultados, el extracto metanólico del fruto de *T. peruviana* es citotóxico para las líneas celulares de cáncer, pero es moderadamente activo en células Vero e inactivo en las células saludables de fibroblastos humanos. En contraste, el control positivo de doxorrubicina demostró tener una citotoxicidad indiscriminada ante las células de cáncer como a las normales de vero y fibroblastos.

TABLA 4. Valores de CI_{50} para el extracto metanólico del fruto de *T. peruviana* en las líneas de cáncer de próstata, mama, colon y pulmón

CI_{50} ($\mu\text{g/ml}$) \pm Error Estándar						
	Líneas celulares de cáncer				Líneas normales	
	Próstata	Mama	Colon	Pulmón	Vero	Fibroblastos
Extracto	1.91 ± 0.76^a	5.78 ± 2.12^a	6.30 ± 4.45^a	12.04 ± 3.43^a	57.02 ± 14.8^a	1578 ± 301^a
Doxorrubicina	102.6 ± 9.38^b	0.67 ± 0.1^b	9.51 ± 0.92^a	0.83 ± 0.24^b	1.68 ± 0.68^b	1.21 ± 0.29^b

Las líneas celulares de cáncer fueron tratadas con diferentes concentraciones del extracto del fruto de *T. peruviana* en placas de 96 pozos por 24 h. Los valores de CI_{50} se expresan como la media \pm el error

estándar de un quintuplicado. Diferentes letras representan diferencias significativas determinadas por ANOVA de un factor ($p < 0.05$).

6.3 El extracto de *T. peruviana* inhibe la habilidad proliferativa

Se investigó el efecto del extracto sobre la habilidad de formación de colonias en las cuatro líneas celulares. El ensayo clonogénico fue llevado a cabo para evaluar las diferencias en la habilidad reproductiva entre las células tratadas y las no tratadas con el extracto crudo de *T. peruviana*. Se depositaron 100 células de cáncer en placas de 6 pozos en presencia o ausencia del extracto y después de un periodo de 10-15 días de incubación, se contaron las colonias formadas. El número de colonias observadas fue inhibido significativamente por el extracto crudo de *T. peruviana* (Fig. 5a). La habilidad de formación de colonias se redujo en un 80% en las células de cáncer de mama y próstata, mientras que en las células de cáncer de pulmón y colon fue reducida en un 70% (Fig. 5b). En contraste, no se observó ningún efecto sobre la habilidad proliferativa de las líneas celulares normales (Fig. 5a, b). El control positivo (doxorrubicina) inhibió la habilidad de formación de colonias, tanto en las líneas normales como en las de cáncer. Estos resultados sugieren que el extracto metanólico del fruto de *T. peruviana* tiene una fuerte actividad antiproliferativa contra los diferentes tipos de células de cáncer sin mostrar alteraciones en las células normales. En contraste, las células tratadas con doxorrubicina no mostraron la presencia de colonias en ninguna línea celular (Fig. 6).

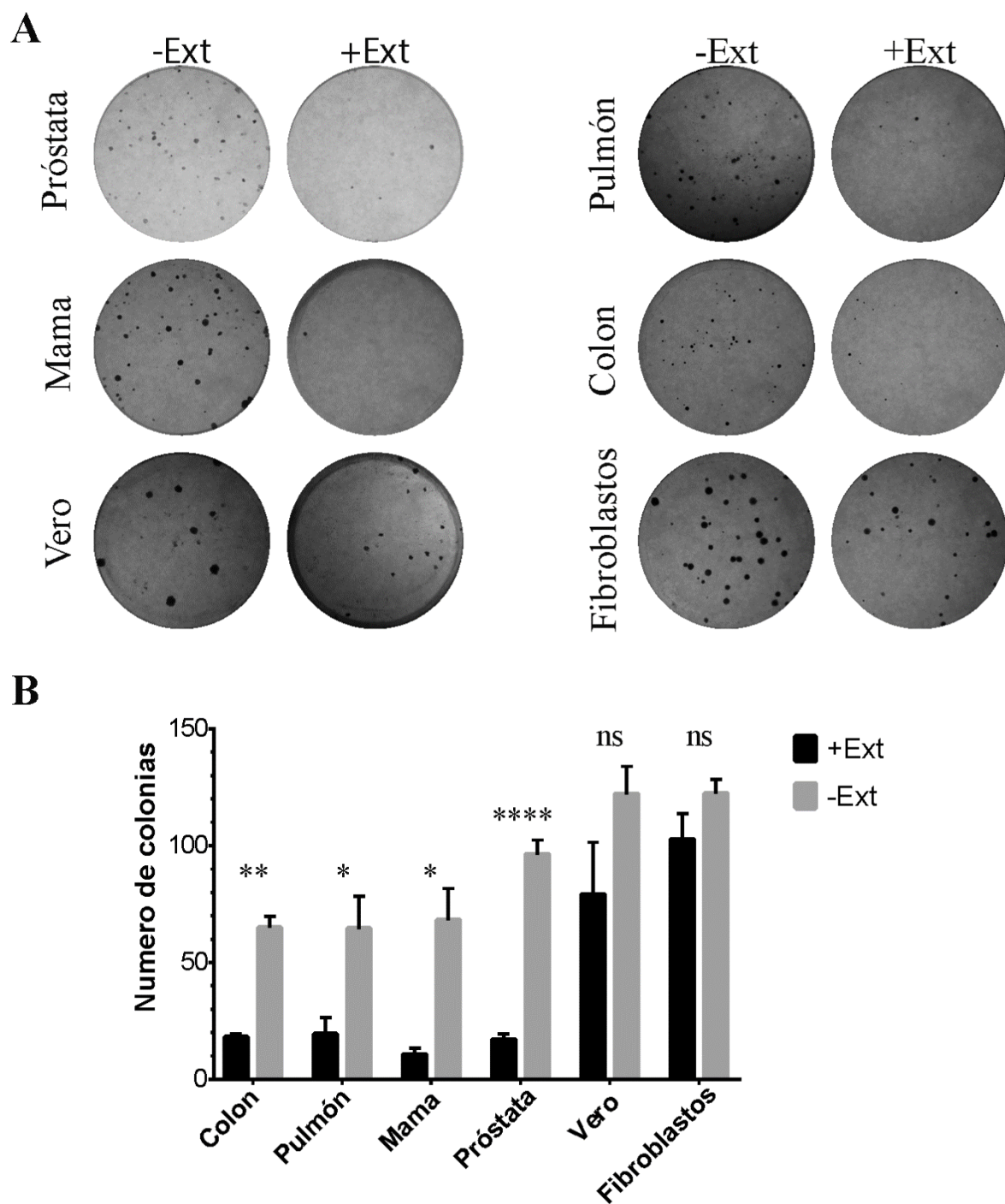


Figura 5. Ensayo clonogénico para las líneas de cáncer tratadas con el extracto de *T. peruviana*. (A) Las imágenes muestran las colonias producidas por la siembra de 100 células de líneas de cáncer, seguido de 10-14 días de incubación. Las células fueron tratadas con sus CI_{50} correspondientes para cada línea celular; (B) Las células fueron cuantificadas y la barra de error indican la media \pm el error estándar de tres experimentos independientes. El nivel de significancia fue determinado usando la prueba T-Student con ns representando $p > 0.05$, ****representa $p < 0.0001$, **representa $p < 0.01$ and *representa $p < 0.05$.

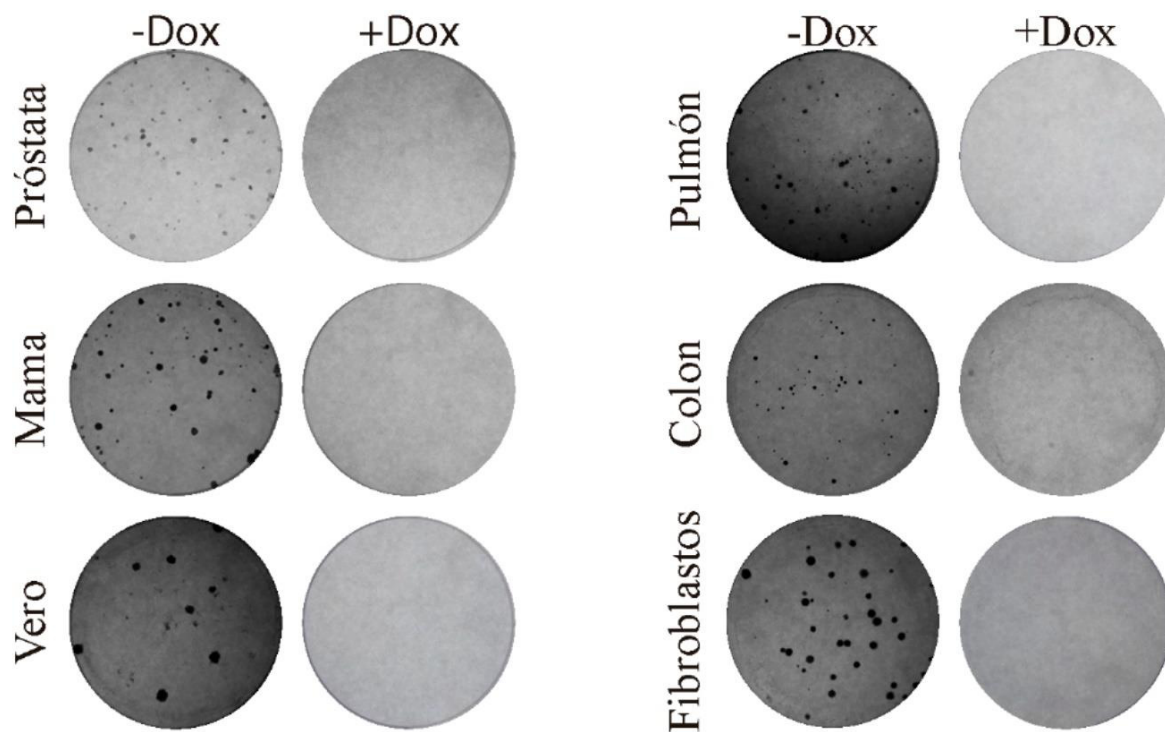


Figura 6. Ensayo clonogénico para las líneas de cáncer tratadas con doxorrubicina. Las imágenes muestran las colonias producidas por la siembra de 100 células de líneas de cáncer, seguido de 10-14 días de incubación. Las células fueron tratadas con sus CI_{50} correspondientes para cada línea celular.

6.4 El extracto de *T. peruviana* afecta la motilidad celular.

Se evaluó el efecto del extracto crudo del fruto de *T. peruviana* sobre la motilidad celular usando el ensayo de “wound and healing”. Las células de cáncer fueron evaluadas en la presencia o ausencia del extracto, se monitorearon hasta que la herida inducida fue cerrada por completo. Las células no tratadas exhibieron un cierre completo de la herida a las 24, 48, 96 y 144 h para las líneas celulares de cáncer de próstata, mama, pulmón y colon respectivamente. En contraste, todas las líneas de cáncer tratadas con el extracto mostraron una dramática inhibición en su capacidad para cerrar la herida (Fig. 7 y 9). El cierre de la herida en las células Vero y los fibroblastos humanos se completó a las 48 h, tanto con el extracto como sin él. Como control positivo se utilizó doxorrubicina (un antitumoral comercial), el cual mostró un incremento en el área de la herida debido a la disgregación de la monocapa tanto en las líneas de cáncer como las normales (Fig. 8 y 9). Estos resultados indican que el extracto metanólico del fruto de *T. peruviana* inhibe y retrasa la migración celular en las cuatro líneas de cáncer.

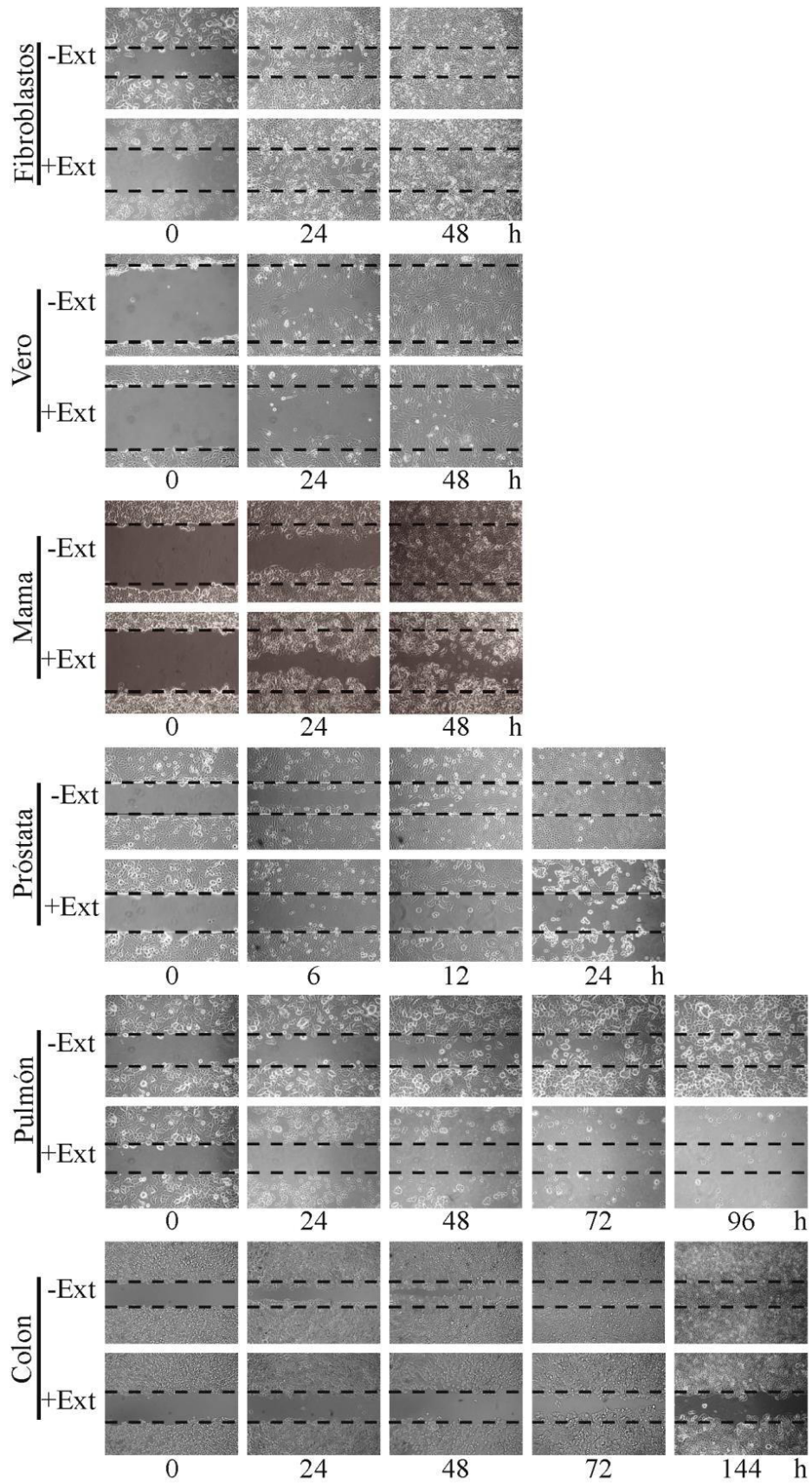


Figura 7. Ensayo “Wound and healing” en líneas celulares de cáncer tratadas con extracto de *T. peruviana*. Fotografías representativas de la herida en la monocapa de células cancerosas después de 24 horas de tratamiento con extracto *T. peruviana* a un valor CI_{50} correspondiente a cada línea celular. Vero y fibroblastos se usaron como líneas celulares normales. Se muestra un resultado típico de tres experimentos independientes.

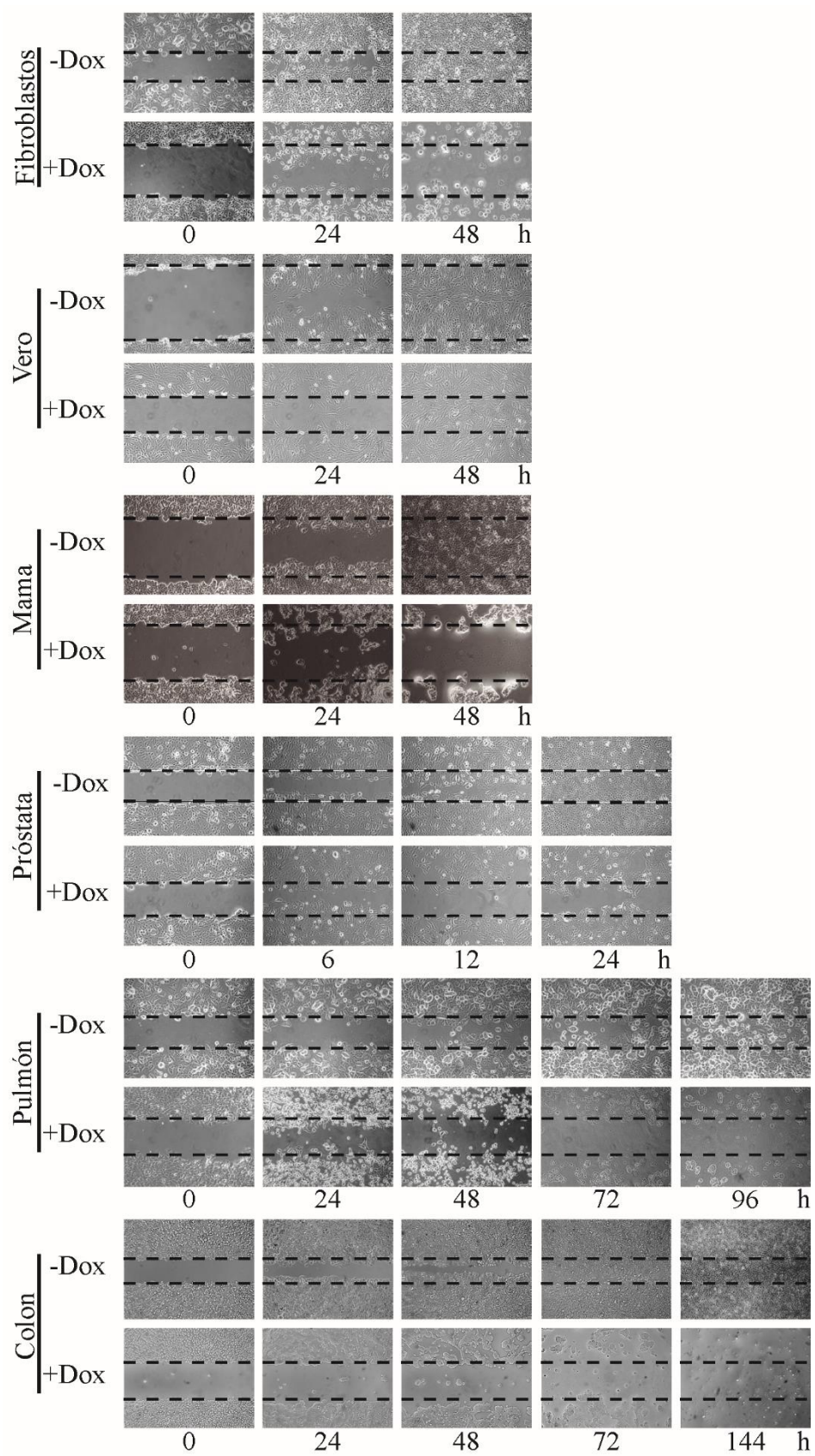


Figura 8. Ensayo “Wound and healing” en líneas celulares de cáncer tratadas con doxorrubicina. Fotografías representativas de la herida en la monocapa de células cancerosas después de 24 horas de tratamiento con doxorrubicina a un valor CI_{50} correspondiente a cada línea celular. Vero y fibroblastos se usaron como líneas celulares normales. Se muestra un resultado típico de tres experimentos independientes.

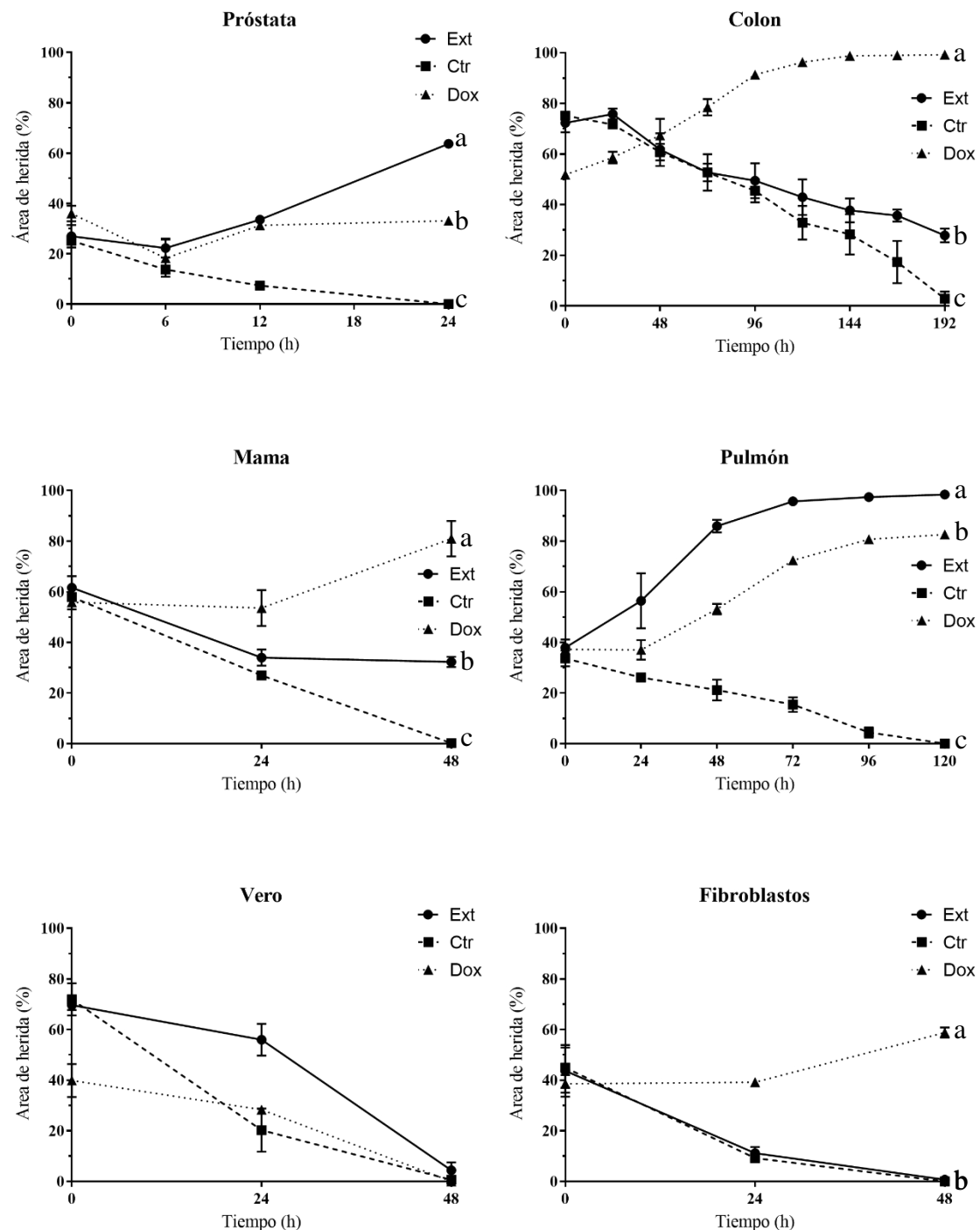


Figura 9. Graficas del ensayo “Wound and healing” en líneas celulares de cáncer tratadas con el extracto metanólico del fruto de *T. peruviana* (Ext), doxorrubicina (Dox) y células sin tratamiento (Ctr). Graficas representativas de la herida en la monocapa de células cancerosas después de 24 horas de tratamiento con el extracto de *T. peruviana* y doxorrubicina a sus CI_{50} correspondiente a cada línea celular. Vero y fibroblastos se usaron como líneas celulares normales. El resultado se representa como el promedio \pm el error estándar de tres experimentos independientes. Letras diferentes representan diferencias significativas determinadas por ANOVA de un factor ($p < 0.05$).

6.5 Cambios morfológicos de cuatro líneas de cáncer expuestas al extracto de *T. peruviana*.

Todas las líneas celulares de cáncer mostraron cambios significativos cuando fueron tratadas con el extracto metanólico del fruto de *T. peruviana* por 24 h (Fig. 10). A las 8 h de incubación, algunas células cambiaron su forma a redondeadas (próstata, pulmón, y mama). Después de las 16 h de tratamiento, las células se encogieron y mostraron contactos celulares interrumpidos. En algunos casos, las células mostraron estar binucleadas y la mayoría de las células se encontraban desprendidas de la base de la placa de cultivo, lo que denota muerte celular. Estos cambios fueron más drásticos para las líneas de cáncer de próstata, mama, y pulmón; que, para la línea de cáncer de colon, y el efecto más prominente fue la presencia de protusiones en la membrana. Debido a que las células no mostraron vacuolación en el citoplasma, consideramos que la autofagia no se encuentra involucrada en el mecanismo de muerte celular (Wasik et al., 2011). Cabe resaltar que las líneas de células normales no mostraron evidencia de alteraciones morfológicas durante las 24 h de tratamiento con el extracto de *T. peruviana*. Cuando el tratamiento control con doxorrubicina fue aplicado, la morfología celular fue alterada tanto en las líneas de cáncer como en las normales (Fig. 11). Estos resultados indican que después de las 8 h de exposición al extracto metanólico del fruto de *T. peruviana*, las células de cáncer presentaron alteraciones morfológicas significativas sin observarse ningún efecto sobre las líneas celulares normales.

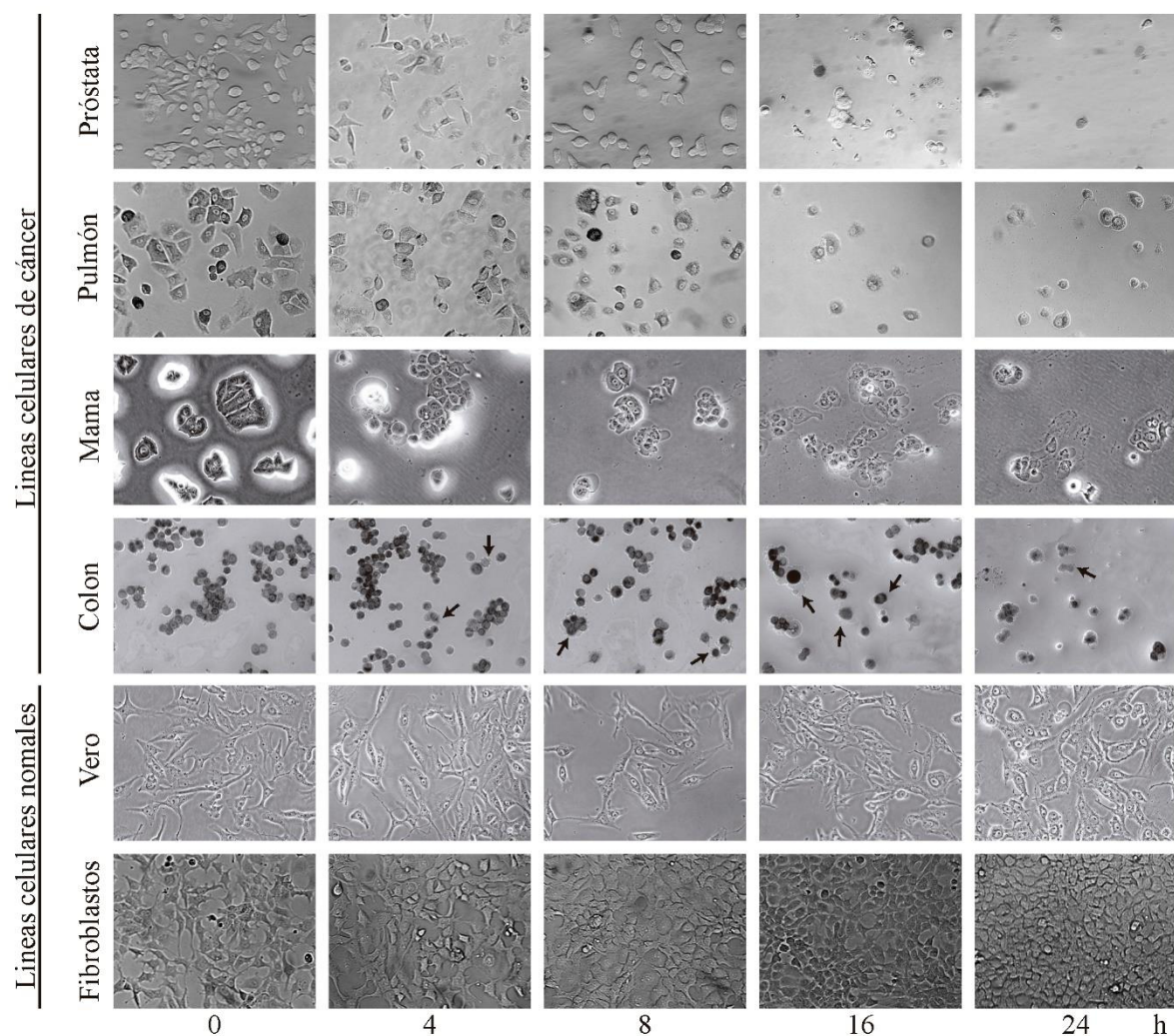


Figura 10. Cambios morfológicos en las líneas de cáncer durante el tratamiento con el extracto de *T. peruviana*. Las células de cáncer fueron tratadas con sus valores correspondientes de CI_{50} para cada línea celular y monitoreadas durante 24 h. Las flechas negras indican la presencia de las protusiones en la membrana.

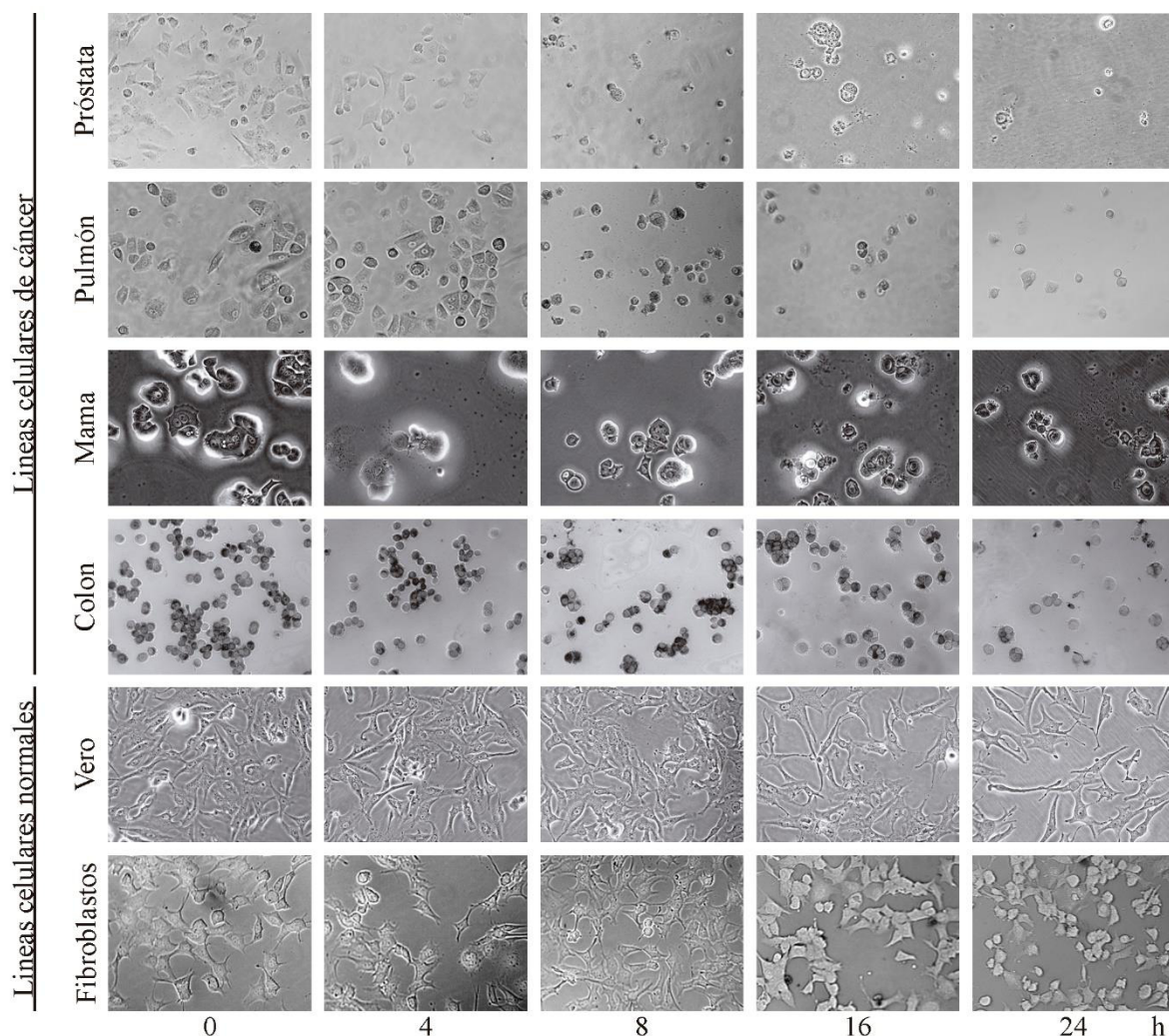


Figura 11. Cambios morfológicos en las líneas de cáncer durante el tratamiento con doxorubicina. Las células de cáncer fueron tratadas con sus valores correspondientes de CI_{50} para cada línea celular y monitoreadas durante 24 h.

6.6 El extracto de *T. peruviana* afecta la viabilidad en forma tiempo-dependiente.

Se realizó la prueba de exclusión con azul tripano para determinar si la viabilidad de las células de cáncer cambiaba respecto al tiempo durante el tratamiento con el extracto de *T. peruviana*. La pérdida de la integridad de la membrana plasmática puede ser verificada usando colorantes polares, tales como el azul tripano, que excluye a las células con membrana intacta. Observamos que el número de células muertas incrementó de manera tiempo-dependiente en presencia del extracto. El efecto del extracto de *T. peruviana* sobre

la viabilidad de las células de cáncer de mama y próstata fue de 50-60% de viabilidad después de 8 h de tratamiento, mientras que las células de cáncer de pulmón y colon tenían 80 % de viabilidad después de 8 h. Después de las 24 h, las células de cáncer de pulmón, próstata y mama mostraron una viabilidad por debajo del 25 % (Fig. 12). Interessantemente, las células de cáncer de colon fueron menos sensibles, mostrando una viabilidad del 70% después de 24 h de tratamiento. Las células normales de vero y fibroblastos mostraron un pequeño decremento o ningún efecto en la viabilidad durante el tratamiento con el extracto de *T. peruviana*. Este resultado confirma que el extracto del fruto de *T. peruviana* tiene un efecto citotóxico (a nivel de integridad de membrana) sobre los diferentes tipos de células de cáncer mientras que las células normales de fibroblastos no fueron afectadas.

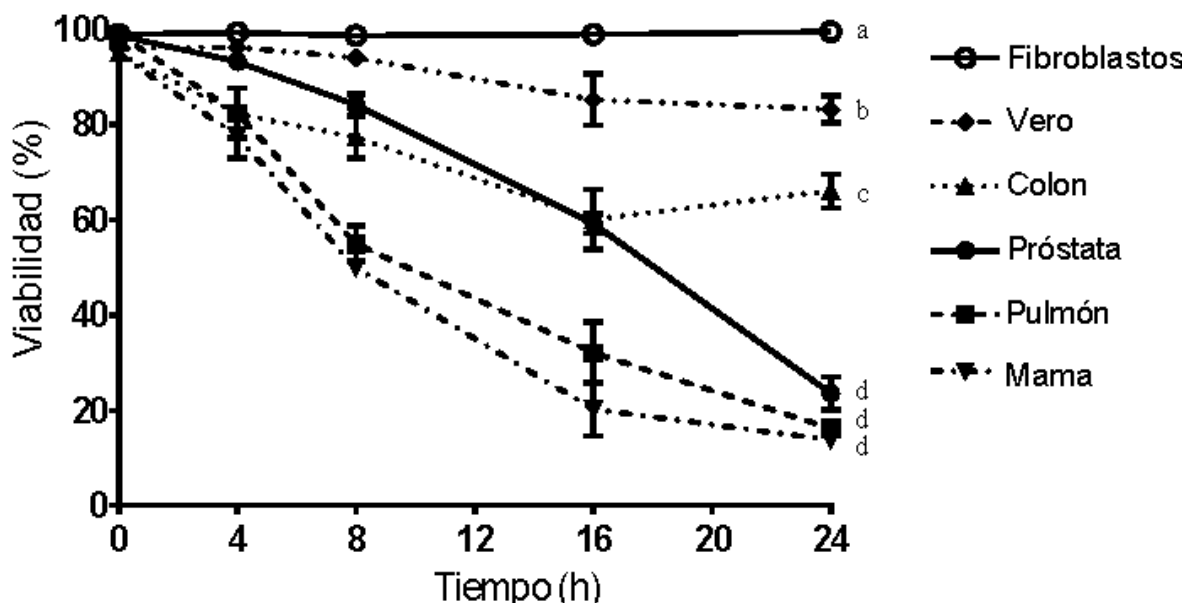


Figura 12. La viabilidad de líneas de cáncer expuestas al extracto de *T. peruviana* durante 24 h. Las células de cáncer fueron tratadas con sus valores correspondientes de CI_{50} . La viabilidad celular fue evaluada usando el método de exclusión de azul tripano. Cada dato representa los valores de tres experimentos independientes. La barra de error indica la media \pm error estándar. Diferentes letras representan diferencias significativas determinadas por ANOVA de un factor ($p < 0.05$).

6.7 La motilidad y la permeabilidad de membrana son las principales características afectadas por el extracto de *T. peruviana*.

Se realizó un análisis multivariado sobre las seis líneas celulares (cuatro de cáncer y dos normales), usando como variables a evaluar: los valores de CI_{50} , el ensayo clonogénico, el ensayo de wound and healing y la permeabilidad de membrana. El Análisis del Componentes Principales (PCA) fue aplicado a todo el conjunto de datos y los tres componentes principales (PC's) fueron responsables del 97.3% de la variabilidad observada. Asumiendo que las direcciones con las varianzas más grandes son las más relevantes biológicamente, estos PC's fueron seleccionados como aquellos con la mayor estructura o varianza, como un paso para quitar el ruido y mejorar los resultados del Análisis de Componentes Individuales (ICA). El ICA obtuvo tres componentes independientes (IC1, IC2 y IC3) con kurtosis negativo (-1.62, -1.42 y -0.12, respectivamente). El trazado de IC1 e IC2, permitió la separación efectiva de las muestras en sus grupos originales (Fig. 13). El ICA fue capaz de distinguir entre la sensibilidad de las células normales (lado derecho) y las cancerosas (lado izquierdo) expuestas al extracto de *T. peruviana* (con las células de cáncer de colon entre ambas poblaciones). El IC1 claramente separa a las células de cáncer de las normales, principalmente debido al efecto del extracto sobre la motilidad celular (ensayo Wound and healing) y la permeabilidad celular, mientras que el IC2 separa las muestras principalmente en base al CI_{50} observado para cada línea celular. La respuesta antiproliferativa (ensayo clonogénico) de las células al extracto está representada principalmente por el IC3 (Fig. 14). En resumen, este análisis identificó que las principales características que son afectadas por el extracto de *T. peruviana* fueron la motilidad celular y la permeabilidad de la membrana; y de una manera menos significativa el CI_{50} y la actividad antiproliferativa.

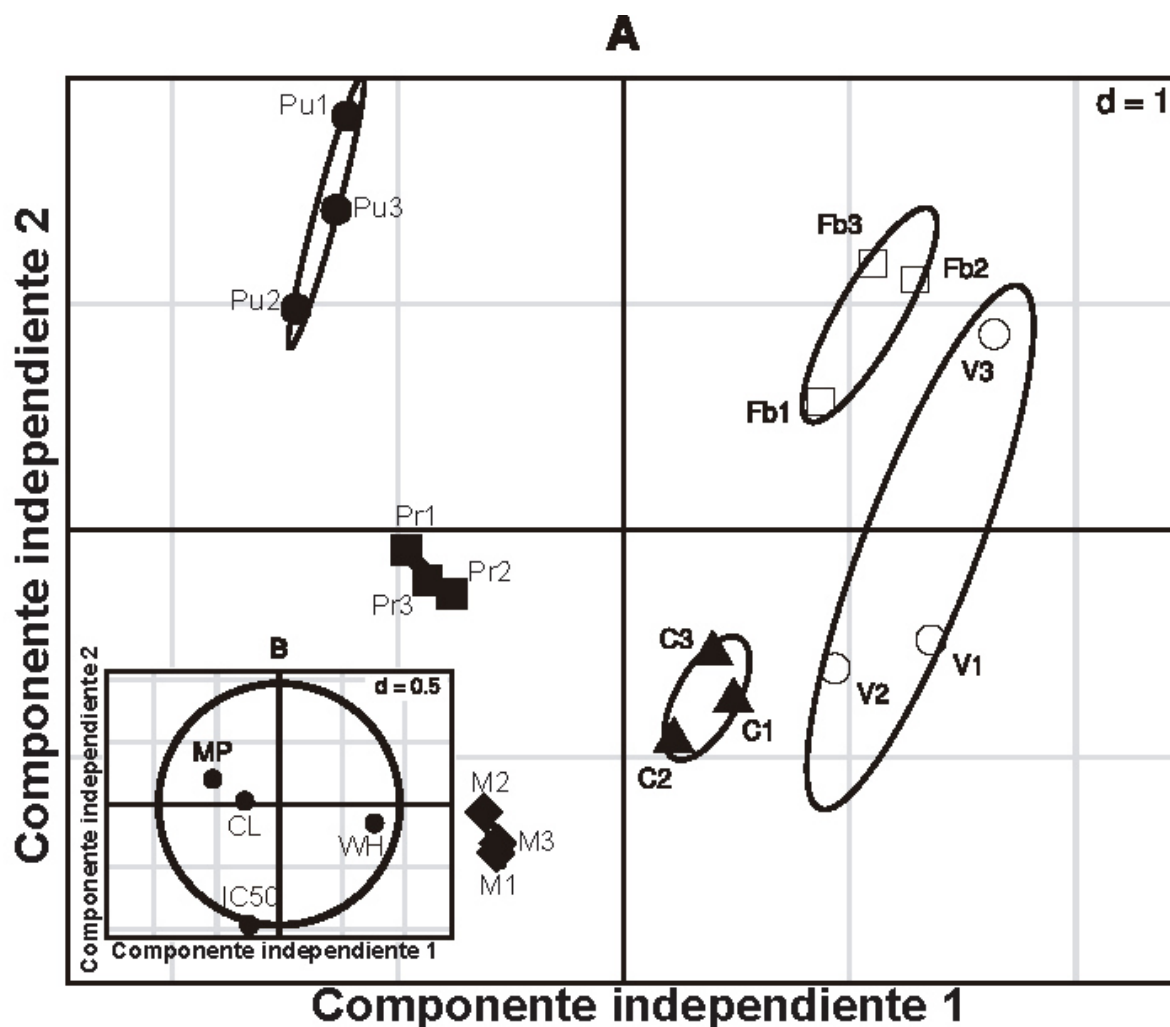


Figura 13. Clasificación de las líneas celulares normales y de cáncer expuestas al extracto de *T. peruviana*, de acuerdo con el análisis de componentes independientes (ICA). La distribución de las líneas celulares (panel A, proyecciones con elipses de confianza de 95%) y las variables (panel B, proyecciones de la carga de variables, con la máxima carga indicadas en el círculo) es mostrada en el espacio separadas por los componentes independientes principales. La clara discriminación no supervisada entre las seis líneas celulares refleja el gran efecto del extracto de *T. peruviana* sobre las líneas celulares de cáncer (células de pulmón, Pu, ●, próstata, Pr, ■, mama, M, ◆, colon, C, ▲), mientras que las células normales son menos afectadas (fibroblastos, Fb, □, Vero, V, ○). El componente independiente 1 es el que separa claramente a las células de cáncer de las células normales, principalmente debido al efecto del extracto sobre la motilidad (WH) y la permeabilidad de membrana (MP). CL (Ensayo clonogénico). IC50 (Concentración inhibitoria media).

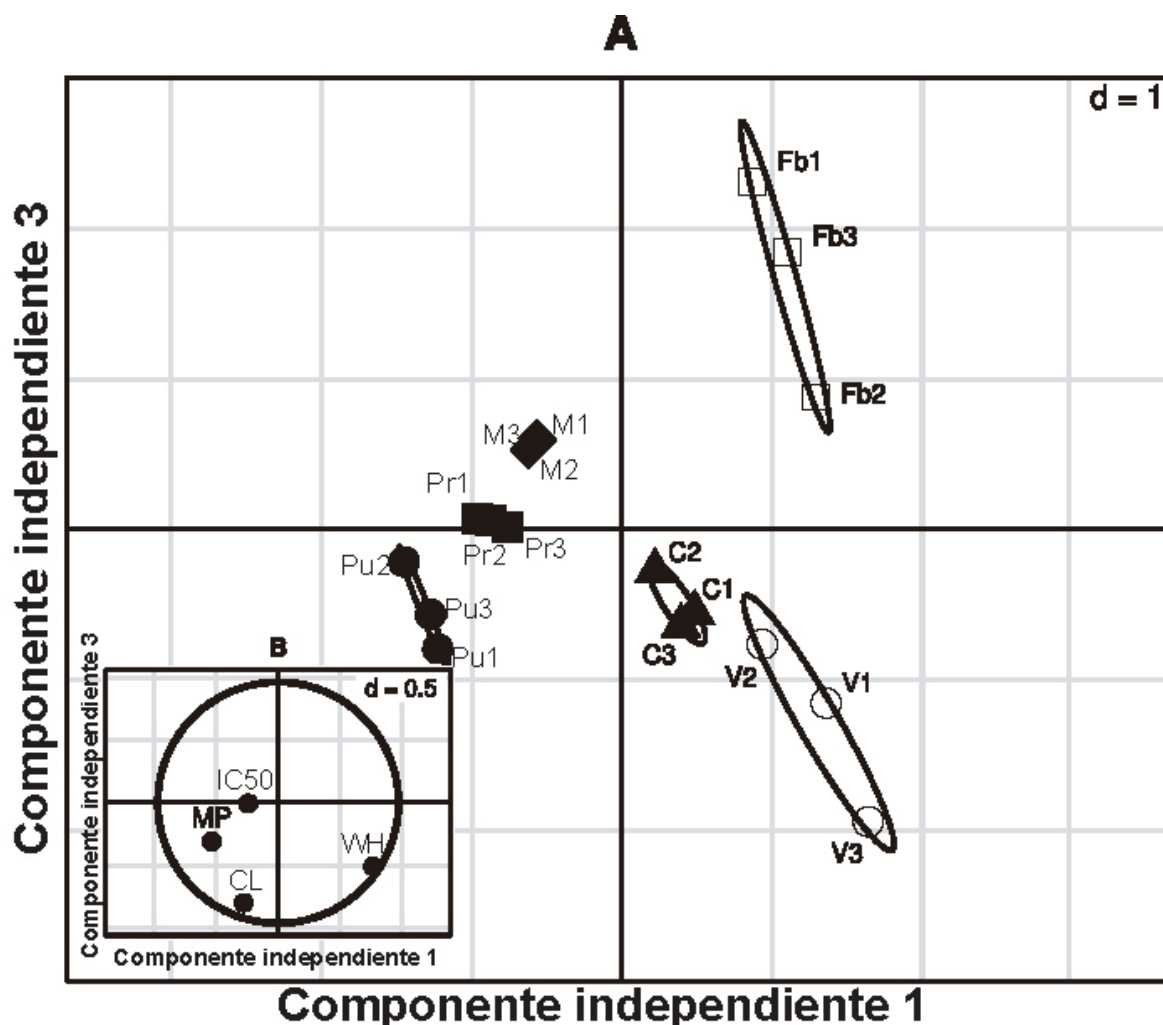


Figura 14. Clasificación de las líneas celulares normales y de cáncer expuestas al extracto de *T. peruviana*, de acuerdo con el análisis de componentes independientes (ICA). La distribución de las líneas celulares (panel A, proyecciones con elipses de confianza de 95%) y las variables (panel B, proyecciones de la carga de variables, con la máxima carga indicadas en el círculo) es mostrada en el espacio separadas por los componentes independientes principales 1 y 3. La clara discriminación no supervisada entre las seis líneas celulares refleja el gran efecto del extracto de *T. peruviana* sobre las líneas celulares de cáncer (células de pulmón, Pu, ●, próstata, Pr, ■, mama, M, ◆, colon, C, ▲), mientras que las células normales son menos afectadas (fibroblastos, Fb, □, Vero, V, ○). El componente independiente 1 es el que separa claramente a las células de cáncer de las células normales, principalmente debido al efecto del extracto sobre la motilidad (WH) y la permeabilidad de membrana (MP), mientras que el componente independiente 3 las separa principalmente por su efecto antiproliferativo (CL) para cada línea celular. CL (Ensayo clonogénico). IC50 (Concentración inhibitoria media).

6.8 El extracto de *T. peruviana* induce la fragmentación del ADN.

La fragmentación del ADN es una característica común en las células que entran en la etapa tardía de la apoptosis (Elmore, 2007). Para determinar si el extracto del fruto de *T. peruviana* podría inducir la fragmentación del ADN y, por lo tanto, inducir apoptosis, se evaluaron células de cáncer con extracto de *T. peruviana* (Fig. 15). Se encontró que las cuatro líneas de cáncer incubadas con el extracto mostraron un perfil de fragmentación de ADN apoptótico similar al del control, doxorrubicina, el cual es conocido por inducir apoptosis (Tacar et al., 2013). No se observó fragmentación en las células no tratadas. Las líneas celulares normales mostraron cantidades muy bajas de fragmentación de ADN comparadas contra las de cáncer.

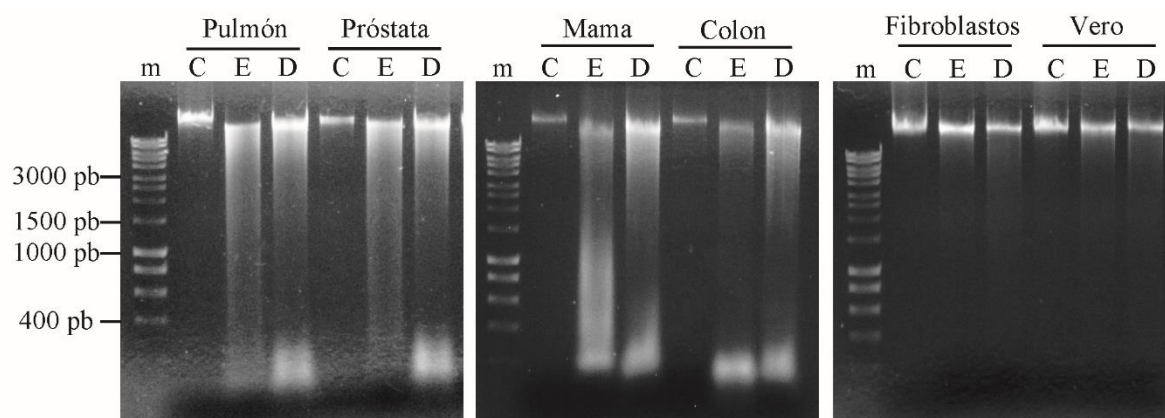


Figura 15. Fragmentación del ADN de las líneas celulares de cáncer tratadas con el extracto de *T. peruviana*. Las líneas celulares de cáncer de pulmón, próstata, mama y colon fueron tratadas con sus valores de CI_{50} correspondientes durante 24h. m, marcador de peso molecular; C, control no tratado; E, células tratadas con el extracto de *T. peruviana* con su valor correspondiente de CI_{50} y, D, células tratadas con el control positivo doxorrubicina (10 μ g/ml). Se muestra el resultado representativo de tres experimentos independientes.

6.9 El extracto de *T. peruviana* induce apoptosis en las células de cáncer de pulmón y próstata.

Se observó que el extracto de *T. peruviana* desencadena cambios morfológicos y fragmentación del ADN de manera tiempo-dependiente que podrían estar relacionados con apoptosis. Para determinar y cuantificar la muerte celular mediada por apoptosis, se utilizó la tinción dual fluorescente con BE/NA. El naranja de acridina es un colorante permeable a la membrana que se une a los ácidos nucleicos de las células vivas. El bromuro de etidio por otra parte es un colorante impermeable a la membrana, y penetra solo a las células no viables, uniéndose a las cadenas de ADN. Cuando NA y BE se usan simultáneamente, las células viables fluorescen de color verde y las no viables de color rojo bajo la microscopia de fluorescencia. En el experimento las células de cáncer de pulmón y próstata fueron marcadas con BE/NA después de 4 h de tratamiento con el extracto de *T. peruviana*, y la tinción dual fue examinada bajo un microscopio de fluorescencia. Las células en fases de apoptosis temprana y tardía se caracterizaron por un núcleo verde o amarillo con forma de “cuentas de rosario” o un núcleo granular naranja (formado por la condensación o fragmentación de la cromatina). Estas células se observaron en los grupos tratados con el extracto de *T. peruviana* y el grupo tratado con doxorrubicina (Fig. 16a). Además, las células muertas por necrosis fueron detectadas por estar teñidas de color rojo. No se determinó una presencia significativa de apoptosis en las células no tratadas del grupo control, las cuales mostraron un núcleo teñido totalmente de verde. La cuantificación de la población de células vivas, apoptóticas y necróticas en el grupo control y tratado de las células de cáncer de próstata y pulmón indican que después de las 4 h de tratamiento, las células de cáncer de próstata y pulmón incrementaron la fase de apoptosis temprana en un 40.65% y 41.51% respectivamente (Fig. 16b). Por lo tanto, de acuerdo con nuestros resultados de fragmentación de ADN, el extracto crudo del fruto de *T. peruviana* es un inductor de apoptosis.

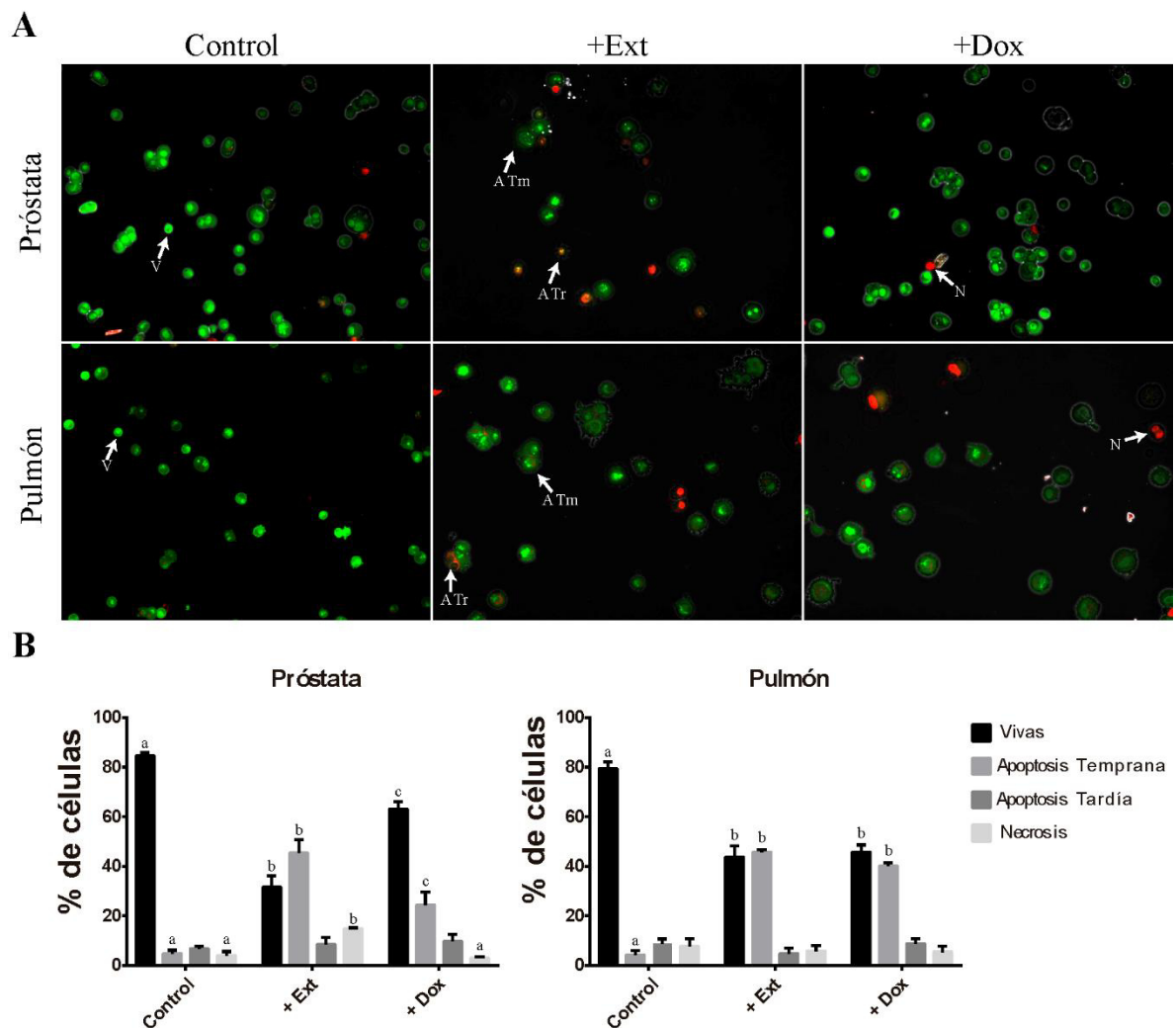


Figura 16. Tinción dual de BE/NA de las líneas de cáncer después del tratamiento con el extracto de *T. peruviana*. **A.** Las células de cáncer de próstata y pulmón fueron tratadas con sus valores correspondientes de CI_{50} del extracto de *T. peruviana*. Las imágenes representan al control (células no tratadas), células tratadas con el extracto y células tratadas con doxorubicina (10 μ g/ml) como control positivo. Las células fueron teñidas con bromuro de etidio y naranja de acridina (BE/NA) después de 4 h de tratamiento. Las flechas blancas indican a las células vivas (V), en apoptosis temprana (A Tm), apoptosis tardía (A Tr) y en necrosis (N). **B.** La barra de error indica la media \pm error estándar de tres experimentos independientes. +Ext y +Dox, indican a las células tratadas con el extracto y doxorubicina, respectivamente. Letras diferentes entre las barras del mismo color representan diferencias significativas determinadas por ANOVA de un factor ($p < 0.05$).

6.10 Identificación de metabolitos de *T. peruviana* por análisis de LC-MS con potencial anticáncer.

El extracto metanólico del fruto de *T. peruviana* fue sometido a cromatografía flash y seis fracciones fueron obtenidas (Fig. 17). Se analizó la actividad citotóxica de cada una de las seis fracciones en la línea celular de cáncer de próstata por el ensayo de MTT. Las fracciones 4 y 5 resultaron ser las más citotóxicas (Tabla 5). La fracción 5 se volvió a fraccionar por cromatografía y se obtuvieron 10 subfracciones (Fig. 18). Se determinó la actividad citotóxica para cada una de las 10 subfracciones en la línea celular de cáncer de próstata por el ensayo de MTT. Las subfracciones Fr5-4 y Fr5-7 mostraron la menor viabilidad del cáncer de próstata, con un 0.43% y 0.94%, respectivamente (Tabla 6). Estas subfracciones fueron analizadas usando una cromatografía UPLC-PDA acoplado con un espectrofotómetro de masas HRESIMS-MS/MS (Fig. 19). Cada pico contenido en las fracciones fue replicado y comparado por su perfil UV, los datos de HRMS en modo positivo y negativo, y por su patrón de fragmentación MS/MS contra un subgrupo de metabolitos de plantas refinados del género *Thevetia* contenido en el Diccionario de Productos Naturales (286,310 compuestos contenidos en la base de datos). Los resultados mostraron que las subfracciones Fr5-4, Fr5-7 y Fr5-10 correspondían a peruvósido, neriifósido y cerberina; respectivamente (Fig. 20). Todos estos son cardenólidos.

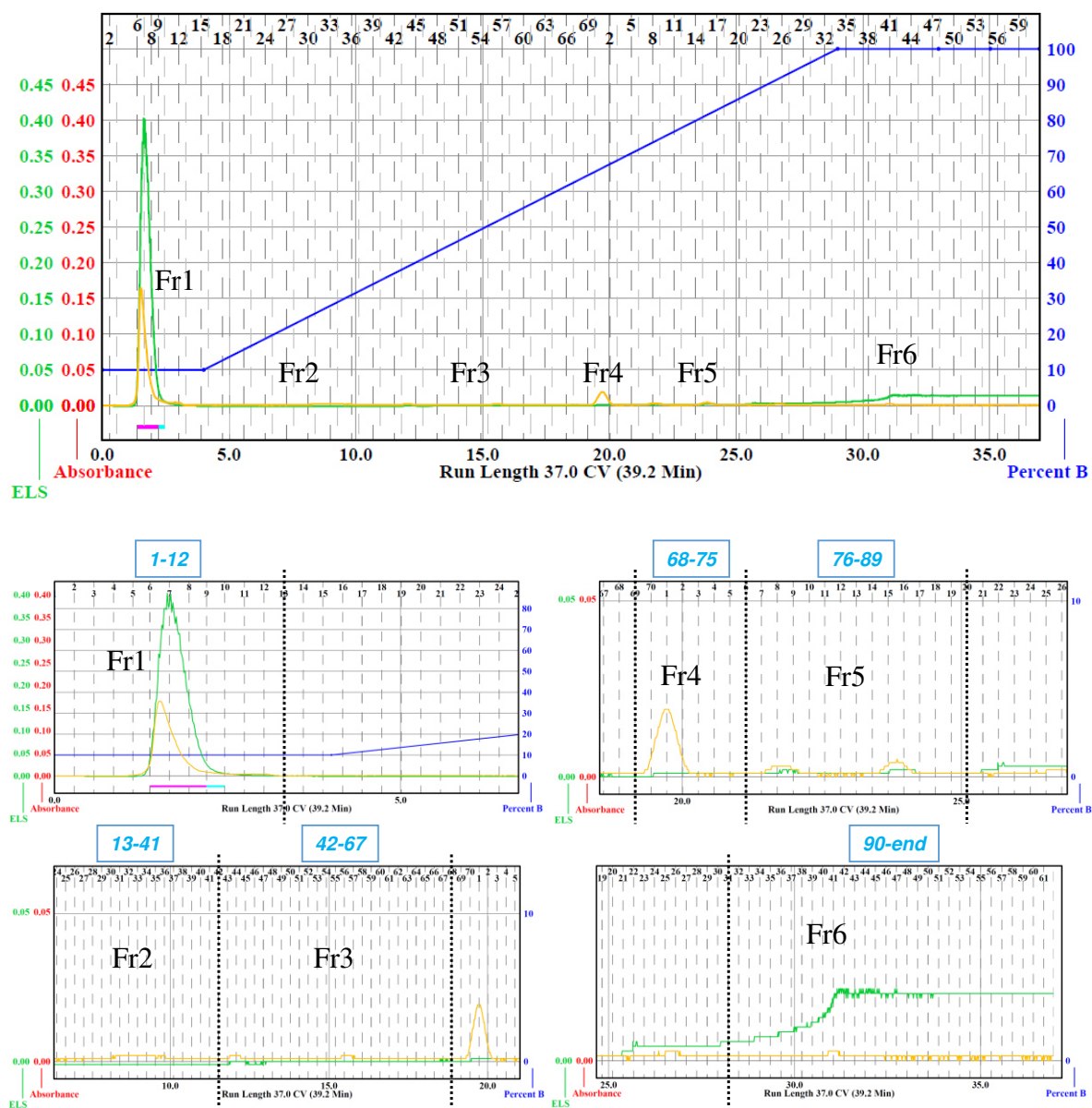


Figura 17. Cromatograma flash en fase reversa del extracto metanólico del fruto de *T. peruviana*.

TABLA 5. Viabilidad celular de las fracciones del extracto de *T. peruviana* en la línea celular de cáncer de próstata (HTB-81)

Fracción	% Viabilidad
1	116 ± 3.7a
2	121 ± 5a
3	103 ± 4a
4	3.71 ± 3.4b
5	1.24 ± 1.9b
6	62 ± 3c

Las fracciones fueron obtenidas por cromatografía flash. La viabilidad celular fue determinada por el ensayo de MTT, los valores se expresan como la media ± error estándar de un triplicado. Diferentes letras representan diferencias significativas determinadas por ANOVA de un factor ($p < 0.05$).

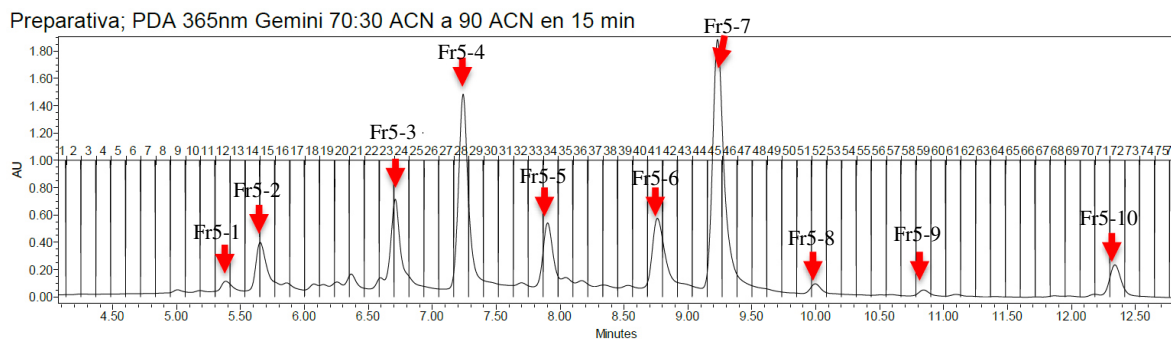


Figura 18. Cromatografía en fase reversa de la fracción 5 del extracto metanólico del fruto de *T. peruviana*.

TABLA 6. Viabilidad celular de las subfracciones de la fracción 5 del extracto de *T. peruviana* en la línea celular de cáncer de próstata (HTB-81)

Subfracciones	Viabilidad (%) en cáncer de próstata (HTB-81)		
	1000 ng/ml	200 ng/ml	20 ng/ml
Fr5-1	26.57±7.21	84.21±6.68	125.64±6.91
Fr5-2	23.6±15.24	77.1±5.43	144.83±2.63
Fr5-3	1.74±0.63	22.31±3.29	122.39±4.8
Fr5-4	0.43±0.22	1.89±0.68	43.44±5.47
Fr5-5	12.09±2.75	94.11±7.94	135.63±6.32
Fr5-6	1.23±0.07	11.97±3.19	103.05±4.99
Fr5-7	0.94±0.19	3.24±0.41	63.89±1.64
Fr5-8	1.45±0.26	25.19±2.66	99.48±9.54
Fr5-9	103.15±3.08	107.1±2.37	111.06±1.67
Fr5-10	1.45±0.19	10.98±0.86	95.44±3.27

Las subfracciones de la fracción 5 fueron obtenidas por cromatografía flash. La viabilidad celular fue determinada por el ensayo de MTT a las concentraciones de 1000, 200 y 20 ng/ml, los valores se expresan como la media ± error estándar de un triplicado.

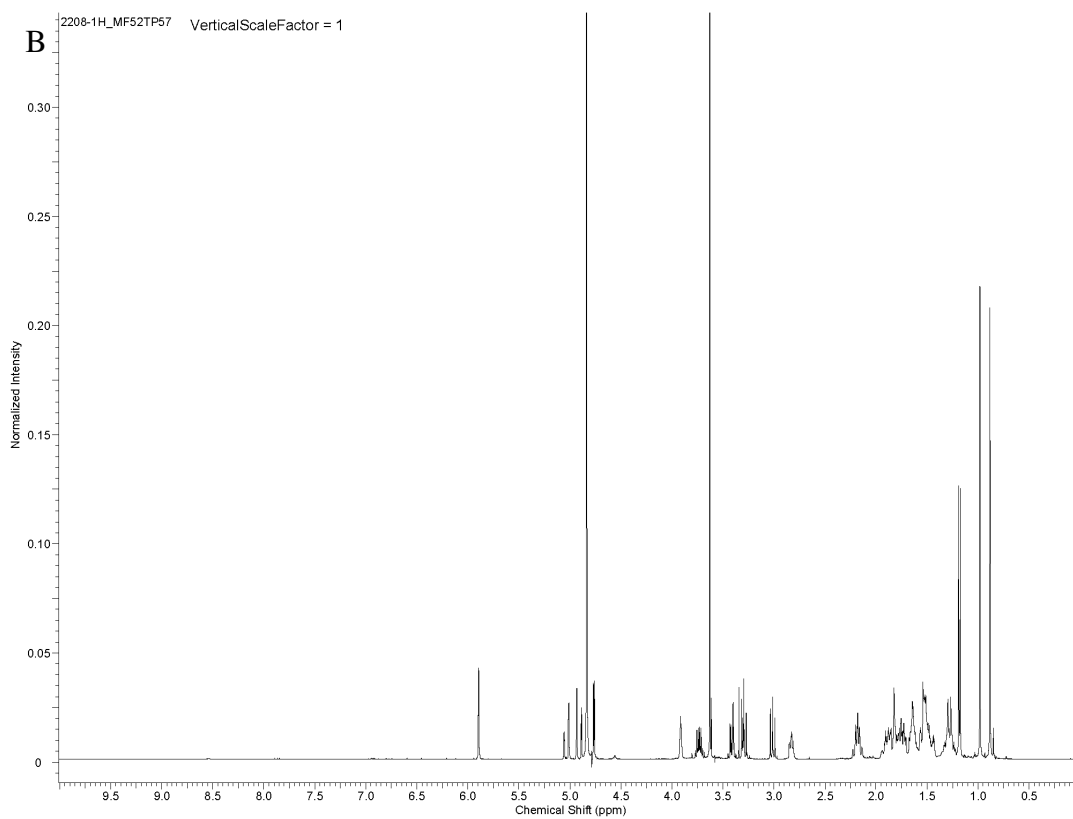
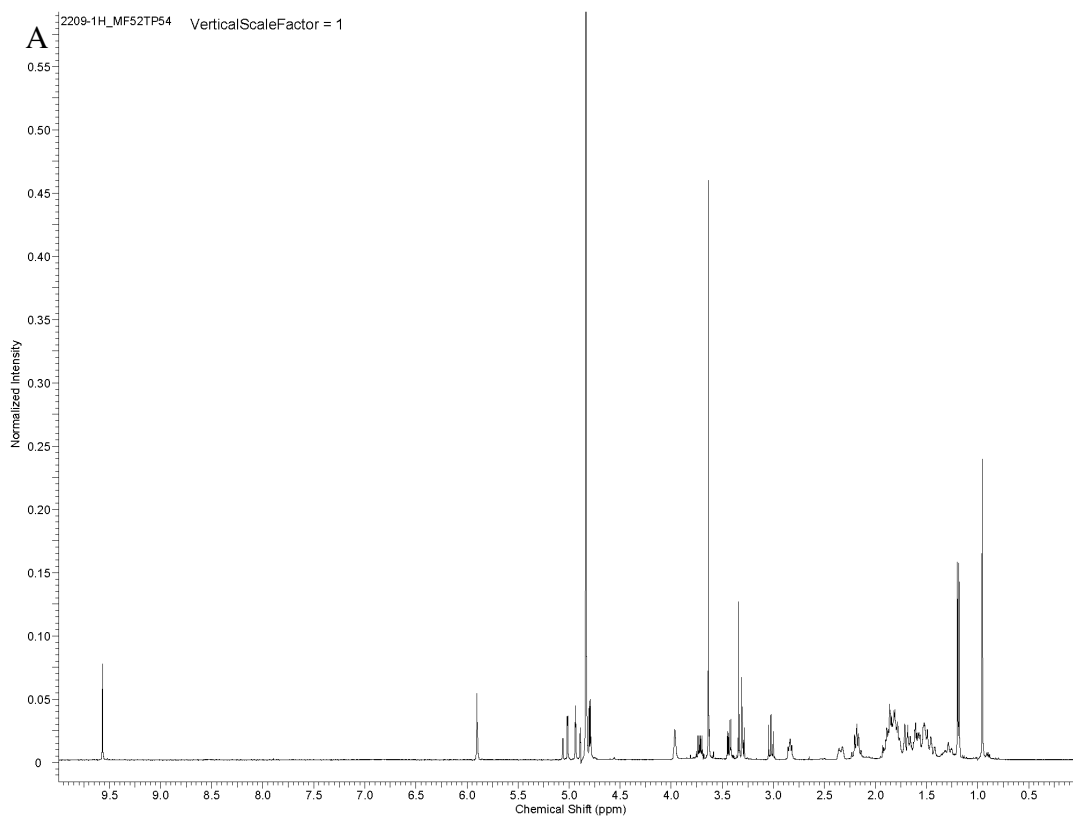


Figura 19. Espectro de masas correspondiente a A: Fr5-4 y B: Fr5-7

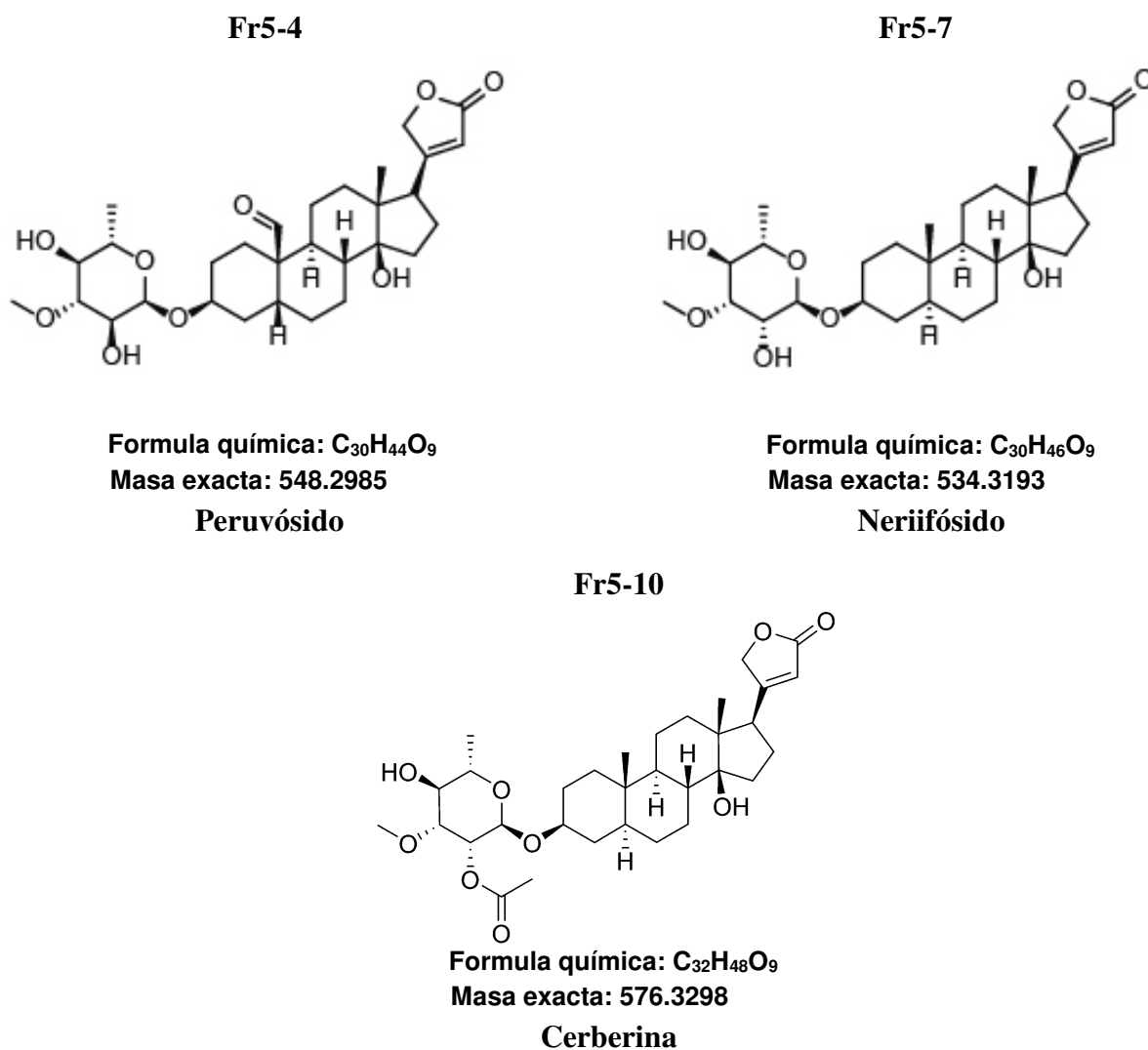


Figura 20. Estructura química de los compuestos de las fracciones Fr5-4, Fr5-7 y Fr5-10. Se muestra la estructura química de los compuestos de peruvósido para la fracción Fr5-4, neriifósido para la fracción Fr5-7 y cerberina para la fracción Fr5-10, así como su fórmula química y masa exacta.

6.11 Actividad citotóxica del neriifósido y peruvósido en células de cáncer de próstata, colon, leucemia, melanoma, ovario y fibroblastos normales.

Se realizó un ensayo MTT con el propósito de evaluar el efecto citotóxico de cardenólidos (neriifósido y peruvósido) de *T. peruviana* en células de cáncer y comparar su actividad con un antitumoral comercial aislado de plantas: Taxol (Tabla 7). Mientras que el neriifósido fue el compuesto más citotóxico contra las células de leucemia mielógena crónica (K-562) con CI_{50} de 59.6 ng/mL; el peruvósido fue el compuesto más potente contra el cáncer de próstata (HTB-81), leucemia linfoblástica (MOLT-4) y adenocarcinoma de ovario (HTB-161), con CI_{50} de 13.38 mg/mL, 12.87 mg/mL y 43.1 mg/mL, respectivamente. Ambos cardenólidos fueron igual de potentes contra el cáncer de colon (CaCo-2) y más potentes que el antitumoral comercial Taxol (Tabla 7). En contraste, ambos cardenólidos fueron inactivos contra la línea normal de fibroblastos humanos.

TABLA 7. Valores de CI_{50} del peruvósido y neriifósido aislados del extracto de *T. peruviana* sobre líneas de cáncer.

Línea celular	CI_{50} Peruvósido (ng/ml)	CI_{50} Neriifósido (ng/ml)	CI_{50} Taxol (ng/ml)
Próstata (HTB-81)	13.38±1.45 ^a	36.97±1.61 ^b	1491±79 ^c
Colon (CaCo-2)	48.67±4.09 ^a	48.66±7.31 ^a	234±89.41 ^b
Leucemia (Molt-4)	12.87±2.38 ^a	23±4.47 ^b	94.17±17.34 ^c
Leucemia (K562)	117.5±22.92 ^a	59.6±16.86 ^b	124.6±34.4 ^a
Melanoma (HTB-72)	14860±4719 ^a	12045±4507 ^{ab}	5460±1047 ^b
Ovario (HTB-161)	43.1±4.134 ^a	61.46±4.595 ^b	4632±1086 ^c
Fibroblastos	>100000 ^a	>100000 ^a	668.9±252.8 ^b

Las líneas celulares de cáncer fueron tratadas por 24 h con diferentes concentraciones de peruvósido y neriifósido del fruto de *T. peruviana*, y Taxol como control positivo. Los valores de CI_{50} se expresan como

la media \pm el error estándar de tres experimentos independientes. Diferentes letras representan diferencias significativas determinadas por ANOVA de un factor ($p < 0.05$).

6.12 Neriifósido y peruvósido inhiben habilidad proliferativa de la línea de cáncer de próstata.

Para determinar el efecto del neriifósido y peruvósido sobre la proliferación celular del cáncer de próstata, se realizó un ensayo clonogénico, utilizando como control negativo células sin los compuestos puros y como control positivo células tumorales tratadas con taxol. Los resultados del ensayo clonogénico muestra una disminución significativa de la proliferación celular de más del 50 % para peruvósido y alrededor de un 80% para neriifósido y taxol (Fig. 21). Estos resultados concluyen que neriifósido y peruvósido tienen un potente efecto antiproliferativo sobre células tumorales de próstata, indicando que estos podrían ser los responsables del efecto antiproliferativo del extracto metanólico (crudo) de *T. peruviana*.

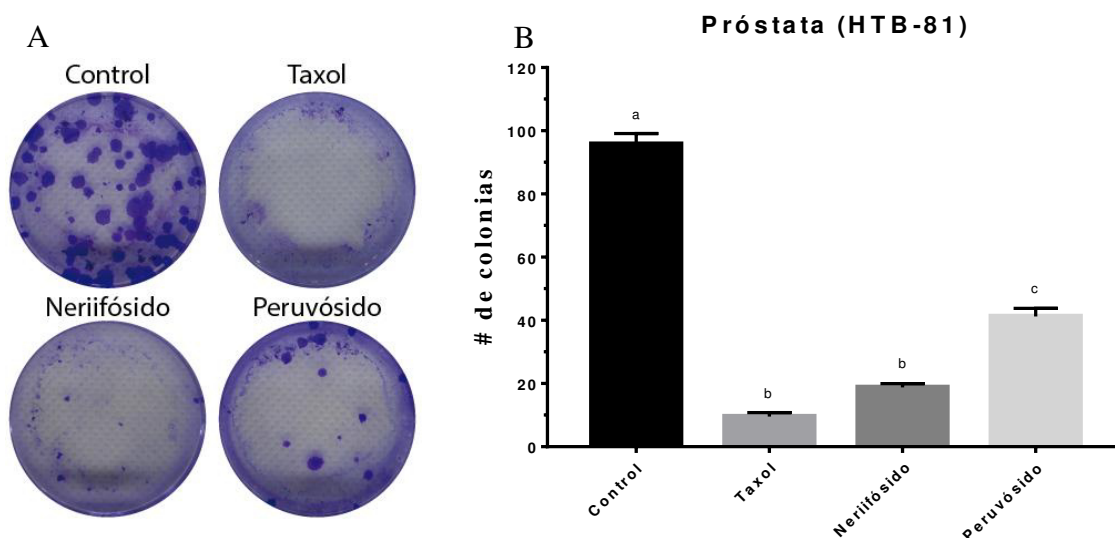


Figura 21. Ensayo clonogénico para la línea de cáncer de próstata HTB-81 tratada con neriifósido, peruvósido y taxol como control positivo. (A) Las imágenes muestran las colonias producidas por la siembra de 100 células de líneas de cáncer, seguido de 10-14 días de incubación. Las células fueron tratadas con sus CI_{50} correspondientes para cada compuesto; (B) Las células fueron cuantificadas y la barra de error indican la media \pm el error estándar de tres experimentos independientes. Diferentes letras representan diferencias significativas determinadas por ANOVA de un factor ($p < 0.05$).

6.13 Neriifósido y peruvósido inhiben la capacidad de invasión de la línea celular de cáncer de próstata.

A diferencia del ensayo de “wound and healing” que evalúa la capacidad de migración o movilidad de las células sobre una superficie plana, el ensayo de invasión evalúa la capacidad de las células de invadir a través de la matriz extracelular y atravesar membranas, el cual es un paso determinante en el proceso de metástasis. Esto se logra a partir de la barrera que forma el matrigel (compuesto por proteínas de la matriz extracelular de sarcoma de ratón) y la membrana de la cámara transwell que emulan la matriz extracelular y el endotelio de los vasos sanguíneos. Se sabe que el cáncer de próstata puede propagarse a otras partes del cuerpo, originando metástasis principalmente en vejiga, huesos y ganglios linfáticos (Bubendorf et al., 2000). Los resultados obtenidos muestran que peruvósido y neriifósido tiene una gran capacidad para inhibir esta cualidad de las células de cáncer de próstata *in vitro*. Neriifósido y taxol (control positivo) inhibieron la invasión de las células tumorales de próstata aproximadamente en un 80%, mientras que peruvósido redujo la invasión en un 50% respecto al control negativo (células de cáncer de próstata sin tratamiento) (Fig. 22).

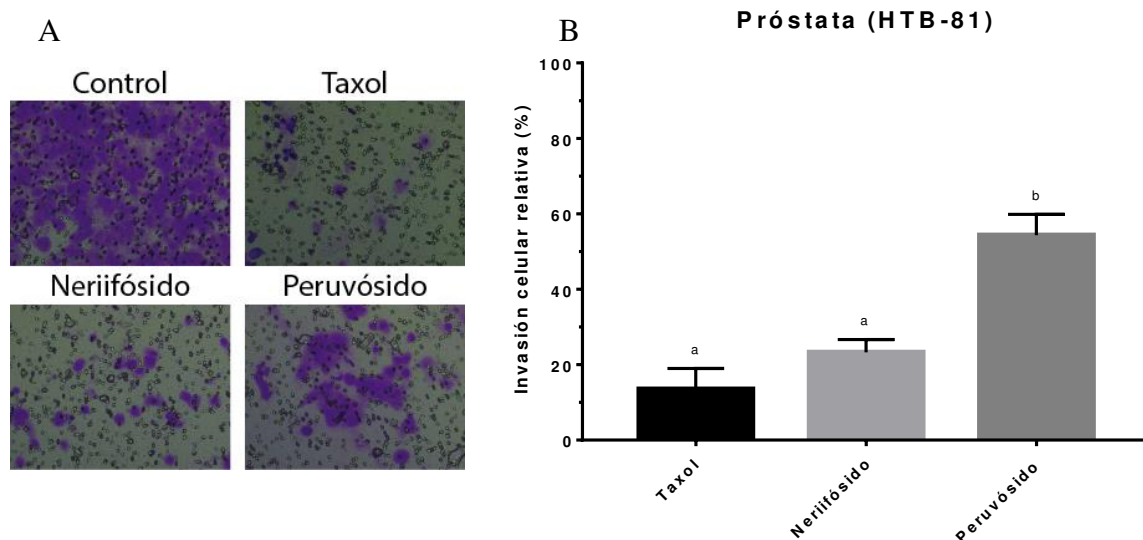


Figura 22. Ensayo de invasión en cámara transwell para la línea de cáncer de próstata HTB-81 tratada con neriifósido, peruvósido y taxol como control positivo. El control negativo son células de cáncer de próstata sin tratamiento. (A) Las imágenes muestran las células invasoras adheridas a la membrana de la cámara interior que lograron migrar a través del matrigel y los poros de la membrana después de 48 h de incubación. Las células fueron tratadas con sus CI_{50} correspondientes para cada compuesto; (B) Las células fueron cuantificadas y la barra de error indican la media \pm el error estándar de tres experimentos independientes. Diferentes letras representan diferencias significativas determinadas por ANOVA de un factor ($p < 0.05$).

6.14 Neriifósido presenta sinergia con taxol y peruvósido en las líneas de cáncer de próstata y leucemia.

En las quimioterapias a menudo se usan combinaciones de fármacos en lugar de usar uno solo para reducir la resistencia del tumor al tratamiento, por lo que es importante identificar los efectos que causan las combinaciones de compuestos sobre la viabilidad celular del tumor. Para esto se calcularon los índices combinatorios de acuerdo con el método Chou-Talalay (Chou, 2010), el cual indica que índices combinatorios mayores a 1 representan antagonismo entre los compuestos, índices iguales a 1 representan efecto aditivo e índices menores a 1 representan sinergia entre los compuestos. En los resultados obtenidos se observan que las combinaciones de neriifósido-taxol en sus CI_{50} pueden causar más de un 90% de mortalidad tanto en cáncer de próstata como en la leucemia linfóide, peruvósido-taxol alrededor de un 75% y neriifósido-peruvósido causan una mortalidad de 90% (Fig.

23). Con estos datos se calculó el índice combinatorio por medio del software CompuSyn y se descubrió que todas las combinaciones son sinérgicas (Tabla 8)., siendo neriifósido-peruvósido la combinación más sinérgica en la línea de leucemia linfocítica Molt-4 con un índice combinatorio de 0.002 ± 0.001 y neriifósido-taxol la más sinérgica en la línea de cáncer de próstata HTB-81 con un índice combinatorio de 0.15 ± 0.02 . Estos resultados indican que neriifósido y peruvósido podrían ser usados en terapias conjuntas con taxol de manera exitosa.

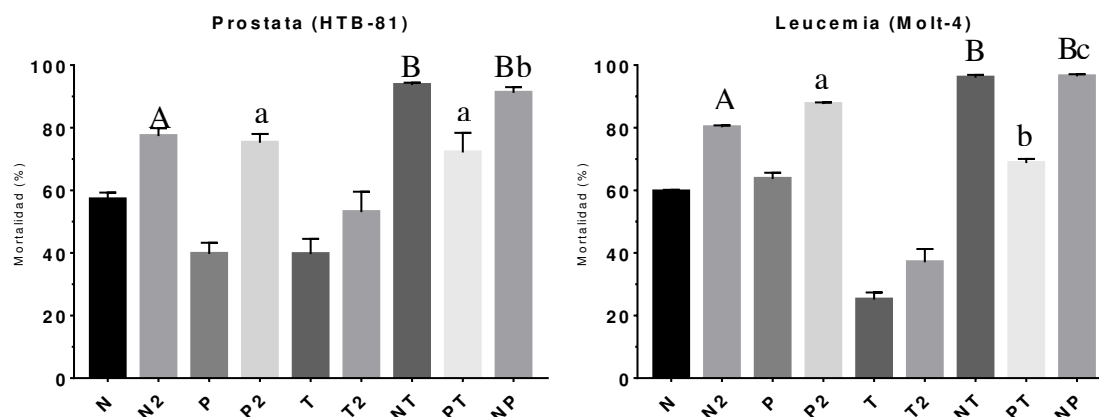


Figura 23. Gráfica representativa de los ensayos de sinergia para la línea celular de cáncer de próstata. N, Neriifósido a su CI_{50} ; N2, Neriifósido a 2 veces su CI_{50} ; P, Peruvósido a su CI_{50} ; P2, Peruvósido a 2 veces su CI_{50} ; T, Taxol a su CI_{50} ; T2, Taxol a 2 veces su CI_{50} ; NT, Neriifósido y taxol a sus correspondientes CI_{50} ; PT, Peruvósido y Taxol a sus correspondientes CI_{50} y NP, Neriifósido y Peruvósido a sus correspondientes CI_{50} . Los resultados son representados como la media \pm error estándar de tres repeticiones. Letras mayúsculas diferentes representan diferencias significativas entre N2, NT y NP determinadas por ANOVA de un factor ($p < 0.05$). Letras minúsculas diferentes representan diferencias significativas entre P2, PT y NP determinadas por ANOVA de un factor ($p < 0.05$).

TABLA 8. Índices combinatorios del peruvósido, neriifósido y taxol sobre líneas de cáncer de próstata y leucemia linfocítica.

Combinaciones	Índice combinatorio
Próstata HTB-81	
Neriifósido-Taxol	0.15±0.02
Peruvósido-Taxol	0.76±0.32
Neriifósido-Peruvósido	0.24±0.08
Leucemia Molt-4	
Neriifósido-Taxol	0.063±0.01
Perubosido-Taxol	0.563±0.13
Neriifósido-Peruvósido	0.002±0.001

Índices combinatorios calculados por el software CompuSyn para las combinaciones de los compuestos neriifósido, peruvósido y taxol. Índices combinatorios mayores a 1 representan antagonismo entre los compuestos, iguales a 1 representan efecto aditivo y menores a 1 representan sinergia. Los valores son representados como la media de tres repeticiones \pm el error estándar.

6.15 Neriifósido y peruvósido causan cambios morfológicos de la línea de cáncer de próstata y leucemia linfocítica.

Neriifósido y peruvósido causan cambios morfológicos en la línea de cáncer de próstata de una manera muy similar a los causados por el extracto metanólico del fruto de *T. peruviana* (Fig. 24). Primeramente, se observa una clara disminución en el número y tamaño de las células, se observan células binucleadas, células despegadas y formación de irregularidades en las membranas. En las células de leucemia linfocítica se puede observar una severa deformación y disminución en el número de células, irregularidades en la membrana, formación de vesículas en el interior de las células y en contraste con las células de próstata las de leucemia aumentaron su tamaño en presencia de los compuestos (Fig. 25). En las células tratadas con taxol se observa un severo cambio en la estructura celular, además de la disminución del número de células.

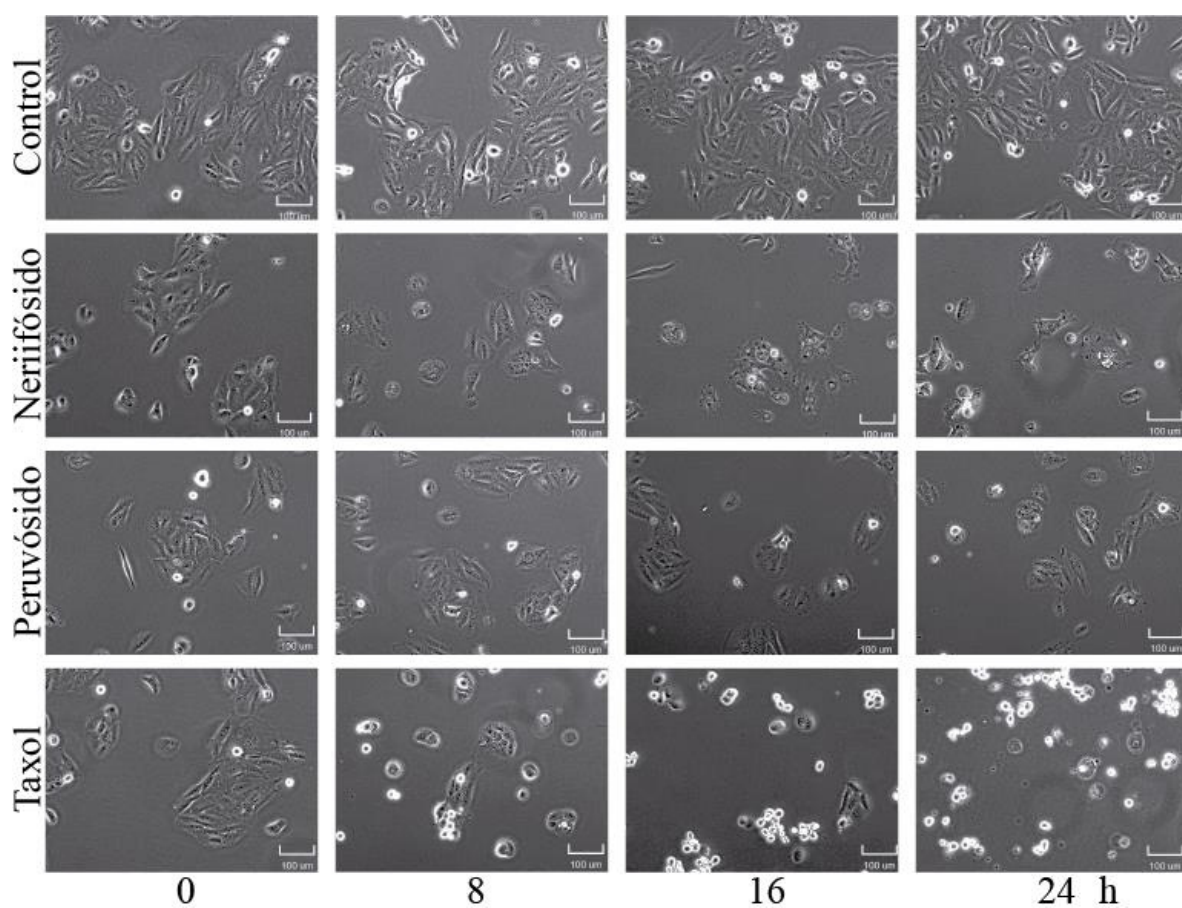


Figura 24. Cambios morfológicos en las líneas de cáncer de próstata HTB-81 durante el tratamiento con neriifósido, peruvósido y taxol. Las células de cáncer fueron tratadas con sus valores correspondientes de CI_{50} para cada compuesto y monitoreadas durante 24 h.

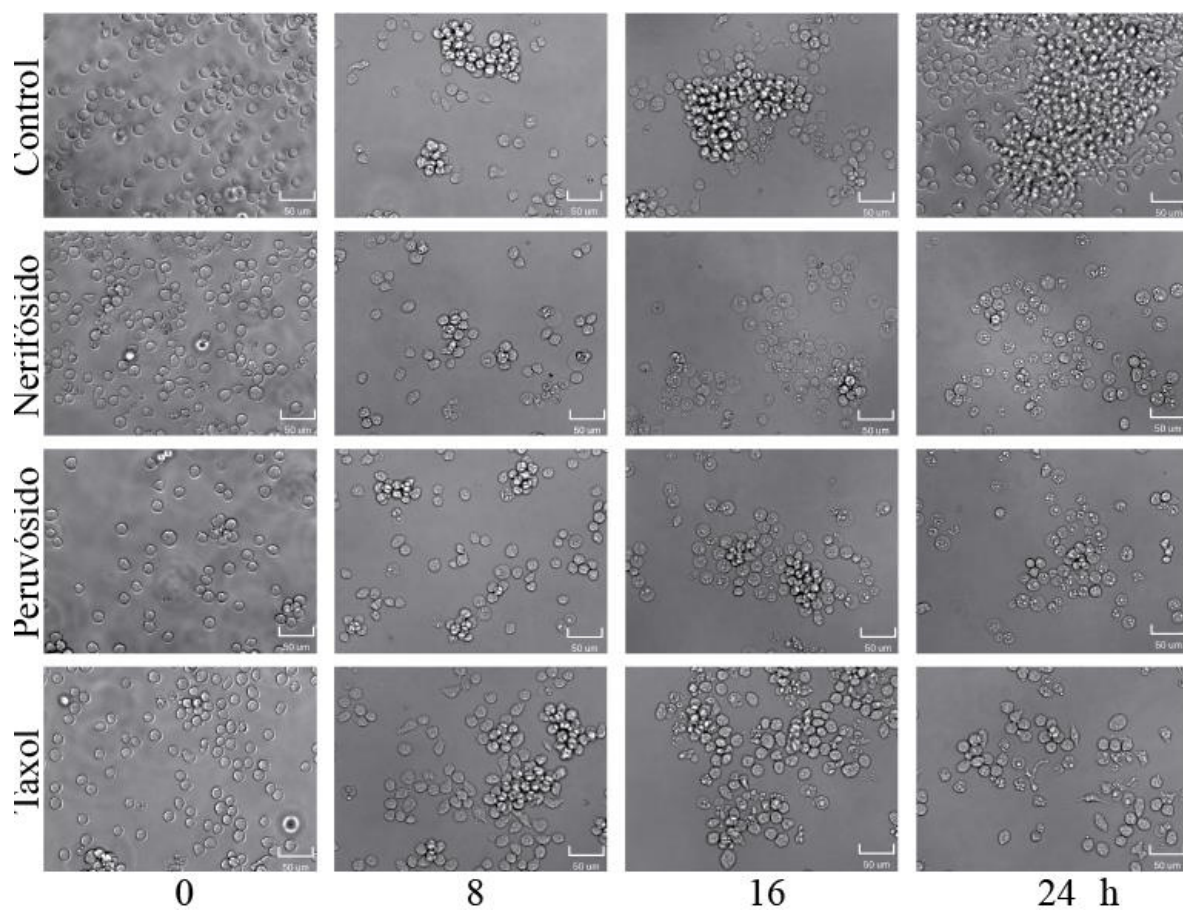


Figura 25. Cambios morfológicos en las líneas de leucemia linfocítica Molt-4 durante el tratamiento con nerifósido, peruvósido y taxol. Las células de cáncer fueron tratadas con sus valores correspondientes de CI_{50} para cada compuesto y monitoreadas durante 24 h.

6.16 Neriifósido y peruvósido inducen la muerte celular por apoptosis

Se realizó la tinción dual de BE/NA para determinar si neriifósido y peruvósido causan muerte celular por apoptosis o necrosis. De una manera similar a la ocurrida con el extracto metanólico de *T. peruviana*, los resultados confirman la presencia de fragmentación de ADN (Fig. 26), así como la formación de cuerpos apoptóticos y la condensación de cromatina teñida por un verde intenso en forma de cuentas de rosario en el interior de las células de las líneas de cáncer de próstata HTB-81 y leucemia linfocítica Molt-4 (Fig. 27a). En la cuantificación de las células representada en la gráfica (Fig. 27b), se observa claramente que neriifósido y peruvósido promueven la aparición de apoptosis temprana después de 4 h de tratamiento a las concentraciones correspondientes a su CI_{50} , con un 40% de células en apoptosis temprana en ambas líneas celulares, respecto a los controles no tratados. No se observaron diferencias significativas en cuanto a la capacidad de causar apoptosis temprana entre taxol, neriifósido y peruvósido, pero se observó una cantidad significativamente mayor de células en fase de apoptosis tardía en las células tratadas con taxol respecto a neriifósido y peruvósido.

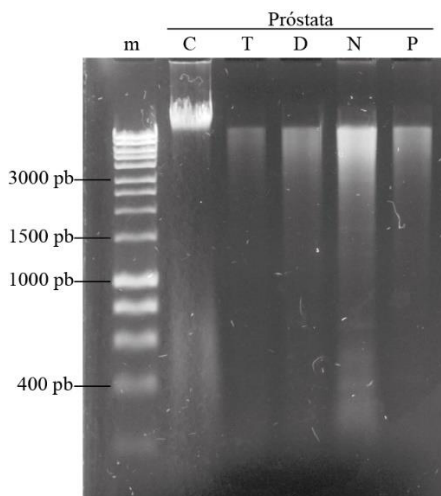


Figura 26. Fragmentación del ADN de las líneas celulares de cáncer tratadas con neriifósido y peruvósido. La línea celular de cáncer de próstata fue tratada con sus valores de CI_{50} correspondientes de neriifósido, peruvósido, taxol y doxorubicina durante 24h. m, marcador de peso molecular; C, control no tratado; N, células tratadas con neriifósido; P, células tratadas con peruvósido; T, células tratadas con taxol y D, células tratadas con doxorubicina. Se muestra el resultado representativo de tres experimentos independientes.

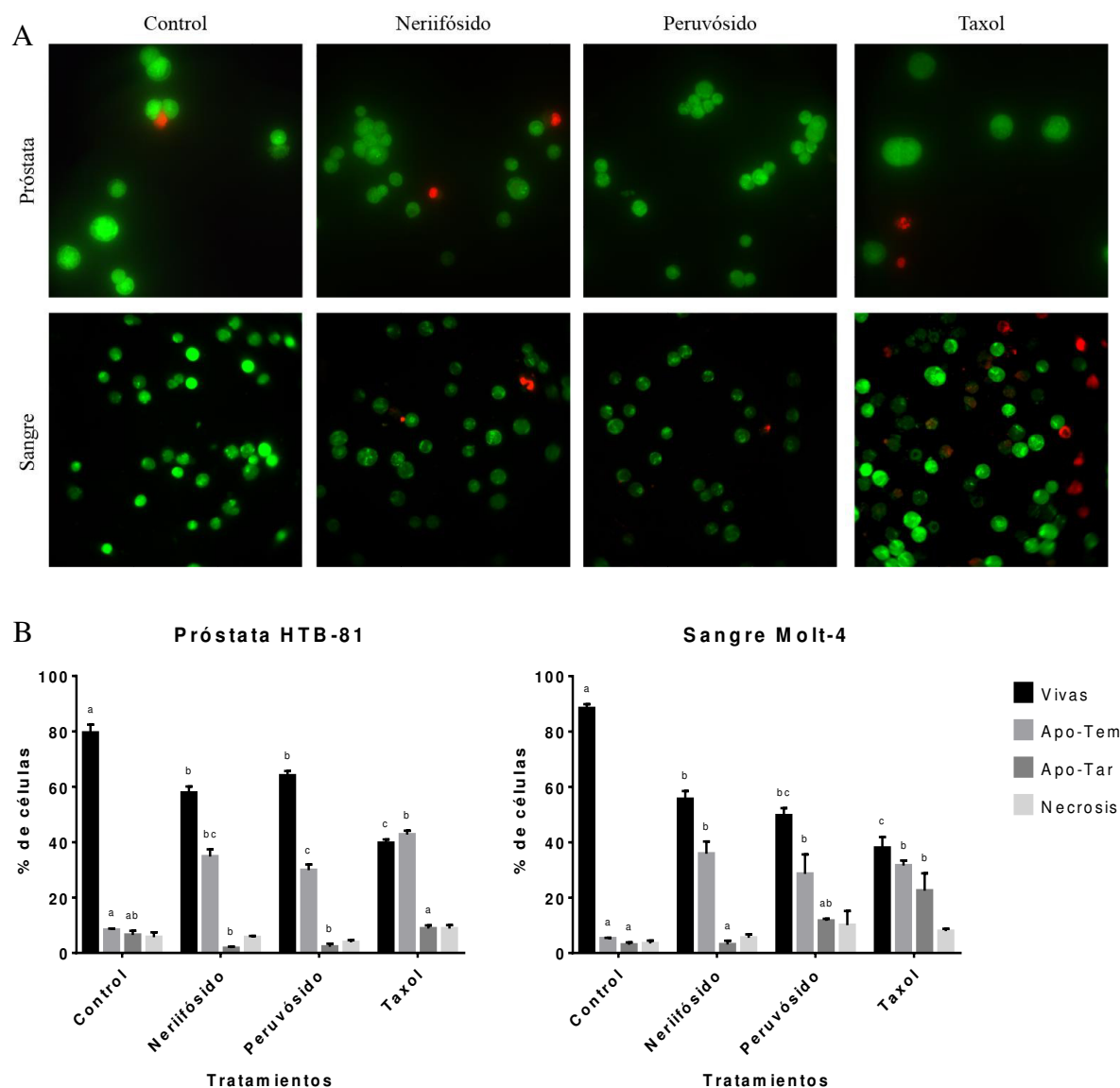


Figura 27. A. Fotografías de la tinción dual de BE/NA de las líneas de cáncer de próstata HTB-81 y leucemia linfocítica Molt-4 con sus valores correspondientes de CI_{50} para cada compuesto. después de 4 h de tratamiento con nerifósido, peruvósido y taxol. **B.** La barra de error indica la media \pm error estándar de tres experimentos independientes. Letras diferentes entre las barras del mismo color representan diferencias significativas determinadas por ANOVA de un factor ($p < 0.05$).

7. DISCUSIÓN

Las plantas son un recurso valioso de moléculas biológicamente activas debido a la presencia de cientos de compuestos biológicamente activos (Kingham et al., 2016). La familia de plantas Apocynaceae, es bien conocida por su actividad anticáncer, principalmente en los géneros de *Catharanthus*, *Nerium*, *Strophanthus*, *Apocynum* y *Thevetia* (Wen et al., 2016). *Thevetia peruviana*, también conocida como árbol de Ayoyote, codo de fraile, adelfa amarilla o nuez de la suerte en el oeste de la India; muestra una diversa gama de propiedades, desde fungir como un carditónico hasta una toxina. Es una planta medicinal usada para tratar diferentes enfermedades, incluyendo cáncer (Martinez, 2004). Las hojas de la adelfa amarilla han sido previamente estudiadas y mostraron que poseen actividad antimicrobiana, antifúngica, antidiarreica, insecticida, moluscocida y raticida (Hassan et al., 2011; Gata-Goncalves et al., 2003; Obasi y Nwachukwu, 2013). Y también ha sido usada tradicionalmente para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales e inflamatorias, fallas cardíacas y tumores de la piel (Alonso-Castro et al., 2011; Oji y Okafor, 2000). Todas las partes de la planta son venenosas debido a la presencia de toxinas cardíacas, pero el fruto de *T. peruviana* es la parte más tóxica de la planta porque tiene la más alta y diversa cantidad de glicósidos cardíacos o cardenólidos. Hay muchos casos conocidos de envenenamiento en humanos a través de la ingestión accidental o intencional de los frutos y hojas de *T. peruviana* (Langford y Boor, 1996). Mientras que el consumo de 10 frutos de adelfa amarilla puede ser fatal para un adulto, el consumo de un solo fruto puede ser fatal para un niño. En el cuadro clínico común se presentan síntomas parecidos al envenenamiento por digitalis con una marcada náusea, vómito, dolor abdominal, diarrea, arritmias cardíacas e hipercalemia (Bandara et al., 2010). Aunque el potencial anticáncer de ciertas partes de *T. peruviana*, como las hojas, corteza y semillas han sido evaluadas contra líneas celulares humanas de cáncer gástrico y pancreático (Tian et al., 2016), el potencial anticáncer del fruto sigue siendo desconocido porque solo unos cuantos glicósidos cardíacos han sido identificados y examinados como agentes citotóxicos. Por lo tanto, en este estudio se analizó la actividad citotóxica y antiproliferativa del extracto metanólico del fruto de *T. peruviana*

en diferentes tipos de cáncer más comunes (colon, mama, próstata, leucemia, melanoma, ovario y pulmón), así como la determinación de sus compuestos naturales activos.

Los experimentos in vitro mostraron que el extracto del fruto de *T. peruviana* exhibió una fuerte citotoxicidad contra líneas de cáncer. Entre las líneas celulares examinadas, la de cáncer de pulmón mostró tener el valor de CI_{50} más alto (12.04 $\mu\text{g/ml}$) que próstata (1.91 $\mu\text{g/ml}$), mama (5.78 $\mu\text{g/ml}$) y colon (6.30 $\mu\text{g/ml}$). Esta variación entre las líneas celulares puede ser atribuida debido a que las células de cáncer poseen diferencias en su estructura genética, morfología y tiempo de duplicación, resultando en una diferencia sustancial al mismo agente citotóxico (Hanahan y Weinberg, 2011). Nuestros resultados, junto con reportes anteriores de actividad citotóxica, sugieren que el extracto metanólico del fruto de *T. peruviana* tiene un gran potencial antiproliferativo.

El cáncer es una enfermedad compleja que se caracteriza por una proliferación de células altamente resistentes a la muerte celular. Un incremento en la velocidad de proliferación es frecuente, debido al hecho que la mayoría de las células de cáncer se dividen más rápido que las células normales. El objetivo de apuntar a la proliferación celular es provocar un arresto en el ciclo celular o inducir la muerte celular usando compuestos citotóxicos. Nosotros aquí mostramos que el extracto metanólico del fruto de *T. peruviana* reduce significativamente la viabilidad celular y la habilidad de las células de formar colonias en cuatro diferentes líneas de cáncer. El ensayo clonogénico es un método que ha sido utilizado para detectar células que mantuvieron su capacidad de producir un gran número de progenie después de un tratamiento con radiación o quimioterapia (Franken et al., 2006). El ensayo clonogénico también se correlaciona con el análisis de tumorigénesis in vivo y predice la respuesta clínica hacia muchos agentes en pacientes con cáncer de mama (Jones et al., 1985). Por lo que, nuestros resultados en el ensayo clonogénico sugieren que el extracto del fruto de *T. peruviana* tiene una potencial actividad anticáncer, limitando la proliferación de las células de cáncer después del tratamiento. Notablemente, las células normales (Vero y Fibroblastos) tratadas con el extracto de *T. peruviana* no mostraron ningún efecto observable en el ensayo clonogénico.

La migración es un paso crítico en la progresión inicial del cáncer, ya que facilita la metástasis. El ensayo de wound and healing, es un método clásico y común, usado para el descubrimiento y la validación de moléculas que afectan la migración celular (Liang et al., 2007; Yarrow et al., 2004) y metástasis (Gulhati et al., 2011). El extracto metanólico del fruto de *T. peruviana* inhibe y retrasa la migración celular de las células de cáncer, pero no la de las células normales. Estos resultados abren la puerta a futuros estudios que podrían confirmar si la actividad citotóxica del extracto del fruto de *T. peruviana*, altera la regulación de la actina del citoesqueleto, induce cambios morfológicos que llevan al desprendimiento de las células, culminando en la muerte celular. Además, la motilidad y la permeabilidad de membrana son las características que fueron principalmente afectadas por el tratamiento del extracto del fruto de *T. peruviana*, de acuerdo con el análisis multivariado realizado sobre las seis líneas celulares y las cuatro variables evaluadas, sugiriendo una potencial actividad antimetastásica del extracto del fruto de *T. peruviana*.

Uno de los mecanismos cruciales y deseables por los que las quimioterapias destruyen las células tumorales es por la inducción de apoptosis. Las células en proceso de apoptosis muestran modificaciones morfológicas y bioquímicas que incluyen la segregación de cromatina, la condensación nuclear, la fragmentación de ADN, la partición de la membrana y la formación de vesículas (Fisher, 1994; Yi et al., 2003). La fase tardía de la apoptosis puede ser visualizada mediante una electroforesis en gel de agarosa, como la formación de un barrido debido al rompimiento del ADN (Rahbar et al., 2015), mientras que ambos (fase temprana y tardía de apoptosis) pueden ser determinadas por la tinción dual de BE/NA. *Cerbera manghas*, una planta perteneciente a la familia Apocynaceae, contiene un glucósido cardíaco, neriifolin, el cual induce la fragmentación del ADN en el carcinoma hepatocelular después de 48 h de tratamiento (Zhao et al., 2011). Aquí, el extracto crudo del fruto de *T. peruviana* mostró muerte celular por inducción de apoptosis temprana (tinción BE/NA) después de 4 horas de tratamiento y apoptosis tardía (ensayo de fragmentación de ADN) después de las 24 h de tratamiento. Este resultado indica que *T. peruviana* podría tener un nivel más alto de actividad apoptótica que otros miembros de la familia Apocynaceae.

El análisis de espectrometría de masas de las fracciones activas del fruto de *T. peruviana*, indicó que el neriifósido, peruvósido y cerberina son metabolitos secundarios presentes en el fruto de la planta, con alta actividad y especificidad citotóxica. Recientes investigaciones de las semillas de *T. peruviana* resultaron en el aislamiento de glucósidos cardiacos que tuvieron efectos inhibitorios contra las líneas de cáncer gástrico y pancreáticos humanos (Tian et al., 2016). Los glucósidos cardiacos son los metabolitos secundarios más estudiados de *T. peruviana*, debido al hecho que estos se usan para el tratamiento de patologías cardíacas (Josephs et al., 2010), pero también están siendo estudiados por su actividad citotóxica y/o actividad apoptótica contra leucemia mieloide (peruvósido) (Feng et al., 2016) y carcinoma hepatocelular (neriifolin) (Zhao et al., 2011). Thevetina y peruvósido, son glucósidos cardiacos de importancia clínica, debido a que son usados para el tratamiento de arritmias (Misra et al., 2009). Ciento nueve cardenólidos han sido aislados e identificados de miembros de la familia Apocynaceae, y alrededor de un cuarto de ellos se han reportado que tienen actividad anticáncer. Los cardenólidos son bien conocidos como sustratos para la ATPasa Na^+/K^+ , la cual es una enzima que regula varias de las vías de supervivencia celular y muerte celular (Wen et al., 2016), y su distribución y expresión relativa son distintas en las células de cáncer comparadas con las normales, indicando que éstas podrían servir como un nuevo blanco con gran potencial para el tratamiento del cáncer. Esta podría ser la razón por la que el análisis multivariado mostró una adecuada separación entre las células normales y las de cáncer, revelando diferencias significativas en su sensibilidad a los compuestos tóxicos en el extracto metanólico del fruto de *T. peruviana*, principalmente debido al efecto en la motilidad y la permeabilidad de la membrana en las líneas de cáncer de próstata, mama, colon y pulmón. La actividad citotóxica del extracto crudo del fruto de *T. peruviana* podría ser atribuida a sus componentes fitoquímicos como: thevetina A, thevetina B, thevenerina y cerberina, que son toxinas (Nesý y Mathew, 2014), y también a los glicósidos cardiacos encontrados en las subfracciones activas reportados en este estudio (neriifósido, peruvósido y cerberina).

En experimentos posteriores se determinó la CI_{50} de neriifósido y peruvósido para las líneas celulares de cáncer de próstata, melanoma, ovario, colon y leucemia mielocítica y linfocítica; y la línea normal de fibroblastos. En esta ocasión se utilizó taxol como un control positivo, ya que está más relacionado por ser un compuesto anticáncer extraído de plantas (Stierle et al. 1993). Los valores de CI_{50} se encontraron en orden de nanogramos para las líneas de cáncer, siendo las líneas de cáncer de próstata y leucemia linfocítica las más sensibles con valores para peruvósido de 12.87 ng/ml para leucemia linfocítica y 13.38 ng/ml para cáncer de próstata; y para neriifósido fueron de 23 ng/ml para leucemia linfocítica y 36.97 ng/ml para cáncer de próstata. En contraste, la CI_{50} de la línea normal de fibroblastos no pudo ser calculada, ya que aún al someterla a 100 μ g/ml de neriifósido o peruvósido, esta no mostró ninguna actividad citotóxica. Esto significa que neriifósido y peruvósido poseen una gran capacidad de selectividad contra las líneas de cáncer, contrastando con la pobre selectividad encontrada en las células de fibroblastos tratadas con taxol, donde se encontró que su CI_{50} es de 668.9 ng/ml. Peruvósido posee algunos estudios recientes de citotoxicidad en líneas de cáncer de pulmón H460, donde determinaron una CI_{50} de 24.67 ng/ml (Kaushik et al., 2017), mientras que en líneas de cáncer de mama MCF-7, MDA-MB-468 y MDA-MB-231 se han reportado CI_{50} de 26.04, 43.79 y 309.83 ng/ml respectivamente (Kaushik et al., 2017); lo cual es comparable con los resultados obtenidos en esta investigación, comprobando que peruvósido posee una alta actividad citotóxica. En cambio, neriifósido a la fecha no posee ningún reporte como agente anticáncer, lo que nos convierte en el primer grupo en evaluar su actividad anticáncer. En otros estudios se ha encontrado que ouabaina, digitoxina y bufalina son más citotóxicas contra células normales MCF10A, 184D y 184A1 que contra células de cáncer MCF7, MDAMB231 y MCF10CA1 (Clifford et al., 2013). Esta información contrasta con los resultados obtenidos con neriifósido y peruvósido, ya que ambos compuestos no solo obtuvieron CI_{50} más bajas que ouabaina, digitoxina y bufalina, sino que también, fueron más efectivos contra las células de cáncer que contra las células normales. Sin embargo, otro estudio con digitoxina en líneas sanguíneas de leucemia y normales de sangre de pacientes, determinaron que digitoxina es más citotóxica para las líneas leucémicas que las normales (Hallböök et al., 2011). Cerberina, uno de los cardenólidos encontrados en *T. peruviana* en este estudio, fue aislada de *Cerbera manghas*

y fue evaluada contra las líneas KB, BC y NCI-H187 con CI_{50} de 1.29, 0.77 y 2.3 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente (Cheenpracha *et al.* 2004).

Una vez que se obtuvieron los valores de CI_{50} , se decidió continuar realizando ensayos sobre las líneas más sensibles; estas líneas fueron las de cáncer de próstata HTB-81 y leucemia linfocítica Molt-4. Dado que la línea de cáncer de próstata es una línea adherente con gran capacidad metastásica (Mori *et al.*, 2007), se decidió evaluar si neriifósido y peruvósido tienen algún efecto sobre la inhibición de la metástasis, utilizando el ensayo de invasión en cámara transwell. En este ensayo las células tienen que hidrolizar la matriz extracelular artificial emulada por el matrigel (compuesto por proteínas de la matriz extracelular de sarcoma de ratón) y una membrana con poros de 8 μm de diámetro simulando la pared del endotelio. Estas condiciones emulan el microambiente en el que se encontraría una célula tumoral en proceso de metástasis. Posteriormente las células son estimuladas para migrar a la cámara exterior por quimiotaxis, debido a la presencia de una mayor concentración de suero fetal bovino en la cámara exterior. Los resultados mostraron que el neriifósido es capaz de inhibir aproximadamente un 80% la invasión celular, cifra muy similar a la obtenida con el tratamiento con taxol, mientras que peruvósido es capaz de inhibir solo un 50% de invasión, cifra similar a la obtenida en estudios con peruvósido en las líneas H460, MCF-7, MDA-MB-468 y MDA-MB-231 (Kaushik *et al.*, 2017a, 2017b). De acuerdo a estudios recientes, el mecanismo por el que los glicósidos cardiotónicos pueden inhibir la metástasis se debe a la regulación negativa de proteínas del sistema EMT como EGFR, β -catenina y vimentina (Kaushik *et al.*, 2017a, 2017b; Kim *et al.*, 2016). Estos resultados confirman que neriifósido y peruvósido tienen una importante actividad antimetastásica y probablemente inhiban proteínas clave en la transición epitelio-mesenquimal. En los ensayos clonogénicos, se obtuvieron resultados similares a los de invasión con neriifósido y taxol, los cuales permitieron la adhesión y proliferación de solo el 20% de las colonias, mientras que el peruvósido permitió la proliferación del 40%. Los posibles efectos de la pérdida de invasión pueden deberse a las alteraciones morfológicas causadas por la presencia de los compuestos. Modificaciones tales como la pérdida de la capacidad de adhesión, cambios en la estructura y consistencia de la membrana afectan considerablemente la capacidad metastásica (Sherbet *et al.*, 1989).

En las células de leucemia linfocítica se observaron dos cambios particulares en cuanto a su morfología, uno es el aumento de tamaño y el otro la formación de vesículas en el interior de las células. El aumento de tamaño puede ser explicado por la alteración en el funcionamiento de las bombas de Na^+/K^+ , que se sabe que es uno de los blancos de acción de los glucósidos cardiotónicos (Wen et al., 2016), la pérdida de la función de estas bombas causa una acumulación de Na^+ en el interior de la célula que posteriormente causa también la acumulación de Ca^{2+} , la acumulación de estos dos iones altera osmolaridad intracelular y la célula para mantener la homeostasis transporta agua dentro de la célula para mantener concentraciones isotónicas. En cuanto a la formación de vesículas podría ser debida a un intento de las células por expulsar los compuestos de su interior, el cual es un conocido sistema de resistencia a quimioterapia que poseen ciertos tipos de cánceres o a la formación de cuerpos apoptóticos (Shedden et al., 2003; Fisher, 1994; Yi et al., 2003).

Posteriormente se evaluó si neriifósido y peruvósido poseen la misma capacidad de desencadenar la muerte celular por apoptosis como lo hace el extracto metanólico del fruto de *T. peruviana* del cual fueron extraídos. Para esto se realizó el ensayo de fragmentación de ADN y la tinción dual de BE/NA y se observó que, tanto neriifósido como peruvósido tienen la capacidad de activar la muerte celular por apoptosis. Se detectaron cantidad similares de células en apoptosis temprana en las células tratadas con neriifósido, peruvósido y taxol, y una mayor cantidad de células en apoptosis tardía en las tratadas con taxol, respecto a neriifósido y peruvósido, lo que podría deberse a que taxol tiene una vía de acción más rápida para causar apoptosis debido a que causan arresto del ciclo celular en la fase de mitosis, impidiendo el desacoplamiento de los microtúbulos cuando separan los cromosomas y por lo tanto, impidiendo a la célula completar la mitosis. Mientras que los glicósidos cardiotónicos requieren llegar a cierta concentración de Na^+ y Ca^{2+} intracelular para ejercer su efecto, estudios recientes han comprobado que los glicósidos cardiotónicos causan arresto del ciclo celular en la fase G0/G1, por medio de una regulación negativa de CDK4 y Cyclina D1 por peruvósido, y covalotoxina en células de cáncer de pulmón (Kaushik et al., 2017; Du et al., 2014).

Otra cualidad importante a considerar es si neriifósido y peruvósido pueden actuar en conjunto con otros quimioterapéuticos, ya que comúnmente se administran en conjunto para minimizar los riesgos de resistencia a la terapia. Para comprobar esto se realizaron ensayos de sinergia para determinar el índice combinatorio por el método de Chou-Talalay (Chou, 2010). Los resultados obtenidos demostraron que las combinaciones de neriifósido-taxol, peruvósido-taxol y neriifósido-peruvósido; son todas de carácter sinérgico. Esto puede deberse a que sus mecanismos de acción pueden estarse complementando; por una parte se sabe que el taxol ataca el citoesqueleto, por medio de la estabilización de las tubulinas, impidiendo su desacoplamiento y por lo tanto, causando arresto del ciclo celular en la fase de mitosis, ya que los cromosomas no podrían separarse de los microtúbulos y completar la mitosis (Yue et al., 2010); mientras que los glucósidos cardiotónicos como neriifósido y peruvósido, actúan interviniendo con las bombas de Na^+/K^+ -ATP, evitando así el intercambio de Na^+ intracelular por K^+ extracelular, ocasionando el acumulamiento de Na^+ intracelular, que a su vez causa la acumulación de Ca^{2+} , causando también estrés en el retículo endoplasmático que puede desencadenar la respuesta apoptótica (Wen et al., 2016; Orrenius et al., 2003). Finalmente, todos los resultados anteriores nos confirman que neriifósido y peruvósido tienen un gran potencial para convertirse en una droga anticáncer, teniendo CI_{50} menores a 50 ng/ml, mucho más bajos que varios compuestos comerciales (tales como: doxorrubicina, taxol, digitoxina, ouabaina y bufalina), presentando casi nula citotoxicidad contra líneas no cancerosas, inhibiendo la metástasis *in vitro*, causando muerte celular por apoptosis y su capacidad de actuar sinérgicamente con otros quimioterapéuticos como el taxol. Es necesario continuar con la investigación de estos compuestos, identificando su mecanismo específico de acción, escalando los ensayos a modelos *in vivo* e investigar posibles mecanismos de biosíntesis química.

8. CONCLUSIONES

El presente estudio presenta evidencia que el extracto metanólico del fruto de *T. peruviana* inhibe la proliferación celular, tiene una actividad citotóxica tiempo dependiente e induce apoptosis en líneas de cáncer humano de (Colon, pulmón, mama y próstata), pero tiene un mínimo o nulo efecto sobre células normales Vero o fibroblastos. El extracto del fruto demostró poseer propiedades anticáncer principalmente a través de mecanismos que incluyen la permeabilidad de membrana, motilidad y fragmentación de ADN. La máxima actividad citotóxica se atribuyó a dos glucósidos cardiacos: neriifósido y peruvósido. Estos compuestos demostraron poseer las mismas capacidades anticáncer que el extracto metanólico de *T. peruviana*, pudiendo actuar como antimetastásico, causando muerte celular por apoptosis y teniendo una actividad citotóxica (de 13.38, 48.67, 12.87, 117.5, 14860 y 43.1 ng/ml para las líneas de cáncer de próstata, colon, leucemia linfocítica y mielocítica; melanoma y ovario respectivamente para peruvósido y 36.97, 48.66, 23, 59.6, 12045, 61.46 ng/ml para las líneas de cáncer de próstata, colon, leucemia linfocítica y mielocítica; melanoma y ovario respectivamente para neriifósido)) mucho mayor a compuestos comerciales como taxol, pero con un efecto mínimo sobre células normales. Adicionalmente, futuras investigaciones *in vivo*, en modelos murinos, resultan esenciales para mostrar todo el potencial para el uso del extracto del fruto de *T. peruviana* y los cardenólidos neriifósido y peruvósido en la terapia contra el cáncer. En conclusión, estos hallazgos muestran la importancia del fruto de *T. peruviana* y sus cardenólidos como recursos de compuestos naturales con potencial anticáncer.

9. PERSPECTIVAS

Debido a los prometedores resultados obtenidos por el extracto metanólico de *T. peruviana* y los glucósidos cardiotónicos aislados (neriifósido y peruvósido), se sugiere que es de importancia investigar el mecanismo de acción específico de estos compuestos y escalar los experimentos en modelos *in vivo*, para poder descubrir parámetros como la dosis letal media en modelo murino y determinar los posibles efectos adversos que pudieran causar neriifósido y peruvósido. Además, es importante investigar el efecto que neriifósido y peruvósido tienen sobre marcadores genéticos de autofagia, proliferación, el sistema de transición epitelio-mesenquimal y apoptosis. Así como evaluar la generación de especies reactivas de oxígeno y arresto al ciclo celular.

También es importante estudiar formas de estimular la biosíntesis de neriifósido y peruvósido de manera *in vivo* o *in vitro*, así como su posible síntesis química.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Adams JM, Cory S. 2007. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene*, 26(9), 1324.
- Akhmanova A, Steinmetz MO. 2015. Control of microtubule organization and dynamics: two ends in the limelight. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 16(12), 711.
- Alizadeh AM, Shiri S, Farsinejad S. 2014. Metastasis review: from bench to bedside. *Tumor biology*, 35(9), 8483-8523.
- Alonso-Castro AJ, Villarreal ML, Salazar-Olivo LA, Gomez-Sanchez M, Dominguez F, Garcia-Carranca A. 2011. Mexican medicinal plants used for cancer treatment: pharmacological, phytochemical and ethnobotanical studies. *Journal of Ethnopharmacology*, 133(3), 945-972.
- Amna T, Puri SC, Verma V, Sharma JP, Khajuria RK, Musarrat J, Spiteller M, Qazi GN. 2006. Bioreactor studies on the endophytic fungus *Entrophospora infrequens* for the production of an anticancer alkaloid camptothecin. *Canadian journal of microbiology*, 52(3), 189-196.
- Aslam J, Khan SH, Siddiqui ZH, Fatima Z, Maqsood M, Bhat MA, Nasim SA, Ilah A, Ahmad IZ, Khan SA, Mujib A. 2010. *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. An important drug: it's applications and production. *Pharmacie Globale (IJCP)*, 4(12), 1-16.
- Bailly C. 2009. Ready for a comeback of natural products in oncology. *Biochemical pharmacology*, 77(9), 1447-1457.
- Baloglu E, Kingston DG. 1999. The taxane diterpenoids. *Journal of natural products*, 62(10), 1448-1472.
- Bandara V, Weinstein SA, White J, Eddleston M. 2010. A review of the natural history, toxinology, diagnosis and clinical management of *Nerium oleander* (common oleander) and *Thevetia peruviana* (yellow oleander) poisoning. *Toxicon*, 56(3), 273-281.
- Baselga J, Campone M, Piccart M, Burris III HA, Rugo HS, Sahmoud T, Noguchi S, Gnani M, Pritchard KI, Lebrun F, Beck JT. 2012. Everolimus in postmenopausal

hormone-receptor–positive advanced breast cancer. *New England Journal of Medicine*, 366(6), 520-529.

Bender RP, Jablonksy MJ, Shadid M, Romaine I, Dunlap N, Anklin C, Graves DE, Osheroff N. 2008. Substituents on etoposide that interact with human topoisomerase II α in the binary enzyme– drug complex: contributions to etoposide binding and activity. *Biochemistry*, 47(15), 4501-4509.

Berdy J. 1995. Are actinomycetes exhausted as a source of secondary metabolites?. *Biotechnologija*.

Blasco MA. 2005. Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nature Reviews Genetics*, 6(8), 611.

Boffetta P, Hashibe M, La Vecchia C, Zatonski W, Rehm J. 2006. The burden of cancer attributable to alcohol drinking. *international Journal of Cancer*, 119(4), 884-887.

Bubendorf L, Schöpfer A, Wagner U, Sauter G, Moch H, Willi N, Gasser TC, Mihatsch MJ. 2000. Metastatic patterns of prostate cancer: an autopsy study of 1,589 patients. *Human pathology*, 31(5), 578-583.

Calderón Montaña JM, Burgos Morón E, Orta Vázquez ML, Mateos Cordero S, López Lázaro M. 2013. A hydroalcoholic extract from the leaves of *Nerium oleander* inhibits glycolysis and induces selective killing of lung cancer cells. *Planta medica*, 79 (12), 1017-1023.

Calderon-Montano JM, Burgos-Moron E, Lopez-Lazaro M. 2014. The in vivo antitumor activity of cardiac glycosides in mice xenografted with human cancer cells is probably an experimental artifact. *Oncogene*, 33(22), 2947.

Chan E WC, Wong SK, Chan HT. 2016. Apocynaceae species with antiproliferative and/or antiplasmodial properties: a review of ten genera. *Journal of integrative medicine*, 14(4), 269-284.

Cheenpracha S, Karalai C, Ponglimanont C, Chantrapromma K. 2004. New cytotoxic cardenolide glycoside from the seeds of *Cerbera manghas*. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 52(8), 1023-1025.

- Chou TC, Martin N. 2007. CompuSyn software for drug combinations and for general dose-effect analysis, and user's guide. Paramus: ComboSyn Inc.
- Chou TC. 2010. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. *Cancer research*, 0008-5472.
- Chow LQ, Eckhardt SG. 2007. Sunitinib: from rational design to clinical efficacy. *Journal of clinical oncology*, 25(7), 884-896.
- Chowdhury I, Tharakan B, Bhat GK. 2008. Caspases—an update. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 151(1), 10-27.
- Christmann M, Verbeek B, Roos WP, Kaina B. 2011. O6-Methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) in normal tissues and tumors: enzyme activity, promoter methylation and immunohistochemistry. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1816(2), 179-190.
- Clark WH. 1991. Tumour progression and the nature of cancer. *British journal of cancer*, 64(4), 631.
- Clifford RJ, Kaplan JH 2013. Human breast tumor cells are more resistant to cardiac glycoside toxicity than non-tumorigenic breast cells. *PLoS One*, 8(12), e84306.
- Cohen GM. 1997. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochemical Journal*, 326(1), 1-16.
- Collins TJ. 2007. ImageJ for microscopy. *Biotechniques*, 43(S1), S25-S30.
- Crighton IL, Dowsett M, Lal A, Man A, Smith IE. 1989. Use of luteinising hormone-releasing hormone agonist (leuporelin) in advanced post-menopausal breast cancer: clinical and endocrine effects. *British journal of cancer*, 60(4), 644.
- Dass K, Ahmad A, Azmi AS, Sarkar SH, Sarkar FH. 2008. Evolving role of uPA/uPAR system in human cancers. *Cancer treatment reviews*, 34(2), 122-136.
- Deep G, Agarwal R. 2010. Antimetastatic efficacy of silibinin: molecular mechanisms and therapeutic potential against cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*, 29(3), 447-463.

Deorukhkar A, Krishnan S, Sethi G, Aggarwal BB. 2007. Back to basics: how natural products can provide the basis for new therapeutics. *Expert opinion on investigational drugs*, 16(11), 1753-1773.

Dholwani KK., Saluja, A. K., Gupta, A. R., & Shah, D. R. (2008). A review on plant-derived natural products and their analogs with anti-tumor activity. *Indian journal of pharmacology*, 40(2), 49.

Dictionary of Natural Products. Version 25.2. <http://dnp.chemnetbase.com/>.

Diederich M, Muller F, Cerella C. 2017. Cardiac glycosides: From molecular targets to immunogenic cell death. *Biochemical pharmacology*, 125, 1-11.

Dou J. 2013. Botanical new drugs: from INDs to NDAs. *Planta Medica*, 79(10), PH4.

Dray S, Dufour AB. 2007. The ade4 package: implementing the duality diagram for ecologists. *Journal of statistical software*, 22(4), 1-20.

Du B, Wang Z, Zhang X, Feng S, Wang G, He J, Zhang B. 2014. MicroRNA-545 suppresses cell proliferation by targeting cyclin D1 and CDK4 in lung cancer cells. *PloS one*, 9(2), e88022.

Duffy MJ, O'siorain L, O'grady P, Devaney D, Fennelly JJ, Lijnen HJ. 1988. Urokinase plasminogen activator, a marker for aggressive breast carcinomas. Preliminary report. *Cancer*, 62(3), 531-533.

Elmore S. 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*, 35(4), 495-516.

Erickson LC, Laurent G, Sharkey NA, Kohn KW. 1980. DNA cross-linking and monoadduct repair in nitrosourea-treated human tumour cells. *Nature*, 288(5792), 727-729.

Eskandani M, Hamishehkar H, Dolatabadi JEN. 2014. Cytotoxicity and DNA damage properties of tert-butylhydroquinone (TBHQ) food additive. *Food chemistry*, 153, 315-320.

- Farah MA, Ali MA, Chen SM, Li Y, Al-Hemaid FM, Abou-Tarboush FM, Al-Anazi KM Lee J. 2016. Silver nanoparticles synthesized from *Adenium obesum* leaf extract induced DNA damage, apoptosis and autophagy via generation of reactive oxygen species. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 141, 158-169.
- Feng Q, Leong WS, Liu L, Chan WI. 2016. Peruvoside, a cardiac glycoside, induces primitive myeloid leukemia cell death. *Molecules*, 21(4), 534.
- Fenical W, Jensen PR. 1993. Marine microorganisms: a new biomedical resource. In *Pharmaceutical and Bioactive Natural Products* (pp. 419-457). Springer, Boston, MA.
- Fisher DE. 1994. Apoptosis in cancer therapy: crossing the threshold. *Cell*, 78(4), 539-542.
- Franken NA, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, Van Bree C. 2006. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nature protocols*, 1(5), 2315.
- Friedenson B. 2007. The BRCA1/2 pathway prevents hematologic cancers in addition to breast and ovarian cancers. *BMC cancer*, 7(1), 152.
- Gann PH, Hennekens CH, Ma J, Longcope C, Stampfer MJ. 1996. Prospective study of sex hormone levels and risk of prostate cancer. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 88(16), 1118-1126.
- Gata-Gonçalves L, Nogueira JMF, Matos O, de Sousa RB. 2003. Photoactive extracts from *Thevetia peruviana* with antifungal properties against *Cladosporium cucumerinum*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 70(1), 51-54.
- Gebäck T, Schulz MMP, Koumoutsakos P, Detmar M. 2009. TScratch: a novel and simple software tool for automated analysis of monolayer wound healing assays: Short Technical Reports. *Biotechniques*, 46(4), 265-274.
- Geisler J, Haynes B, Anker G, Dowsett M, Lønning PE. 2002. Influence of letrozole and anastrozole on total body aromatization and plasma estrogen levels in postmenopausal breast cancer patients evaluated in a randomized, cross-over study. *Journal of Clinical Oncology*, 20(3), 751-757.

- Gordaliza M. 2007. Natural products as leads to anticancer drugs. *Clinical and Translational Oncology*, 9(12), 767-776.
- Grady D, Gebretsadik T, Kerlikowske K, Ernster V, Petitti D. 1995. Hormone replacement therapy and endometrial cancer risk: a meta-analysis. *Obstetrics y Gynecology*, 85(2), 304-313.
- Grant CS. 2005. Insulinoma. Best practice y research *Clinical gastroenterology*, 19(5), 783-798.
- Gray RS, Cheung KJ, Ewald AJ. 2010. Cellular mechanisms regulating epithelial morphogenesis and cancer invasion. *Current opinion in cell biology*, 22(5), 640-650.
- Gulhati P, Bowen KA, Liu J, Stevens PD, Rychahou PG, Chen M, Lee EY, Weiss H.L, O'Connor KL, Gao T, Evers BM. 2011. mTORC1 and mTORC2 regulate EMT, motility and metastasis of colorectal cancer via RhoA and Rac1 signaling pathways. *Cancer research*, canres-4058.
- Gutiérrez-Fernández A, Fueyo A, Folgueras AR, Garabaya C, Pennington CJ, Pilgrim S, Edwards DR, Holliday DL, Jones JL, Span PN, Sweep FC. 2008. Matrix metalloproteinase-8 functions as a metastasis suppressor through modulation of tumor cell adhesion and invasion. *Cancer research*, 68(8), 2755-2763.
- Hallböök H, Felth J, Eriksson A, Fryknäs M, Bohlin L, Larsson R, Gullbo J. 2011. Ex vivo activity of cardiac glycosides in acute leukaemia. *PloS one*, 6(1), e15718.
- Hanahan D, Weinberg RA. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *cell*, 144(5), 646-674.
- Hassan MM, Saha AK, Khan SA, Islam A, Mahabub-Uz-Zaman M, Ahmed SSU. 2011. Studies on the antidiarrhoeal, antimicrobial and cytotoxic activities of ethanol-extracted leaves of yellow oleander (*Thevetia peruviana*). *Open veterinary journal*, 1(1), 28-31.
- Hsu IL, Chou CY, Wu YY, Wu JE, Liang CH, Tsai YT, Ke JY, Chen YL, Hsu KF, Hong TM. 2016. Targeting FXRD2 by cardiac glycosides potently blocks tumor growth in ovarian clear cell carcinoma. *Oncotarget*, 7(39), p.62925.

Jolivet J, Cowan KH, Curt GA, Clendeninn NJ, Chabner BA. 1983. The pharmacology and clinical use of methotrexate. *New England Journal of Medicine*, 309(18), 1094-1104.

Jones SE, Dean JC, Young LA, Salmon SE. 1985. The human tumor clonogenic assay in human breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 3(1), 92-97.

Josephs RD, Daireaux A, Westwood S, Wielgosz RI. 2010. Simultaneous determination of various cardiac glycosides by liquid chromatography–hybrid mass spectrometry for the purity assessment of the therapeutic monitored drug digoxin. *Journal of Chromatography A*, 1217(27), 4535-4543.

Justus CR, Leffler N, Ruiz-Echevarria M, Yang LV. 2014. In vitro cell migration and invasion assays. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (88).

Kamel H, Abdelazim I, Habib SM, El Shourbagy MA, Ahmed NS. 2010. Immunoexpression of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in malignant ovarian epithelial tumours. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada*, 32(6), 580-586.

Kane RC, Dagher R, Farrell A, Ko CW, Sridhara R, Justice R, Pazdur R. 2007. Bortezomib for the treatment of mantle cell lymphoma. *Clinical cancer research*, 13(18), 5291-5294.

Kang MA, Kim MS, Kim W, Um JH, Shin YJ, Song JY, et al. 2016. Lanatoside C suppressed colorectal cancer cell growth by inducing mitochondrial dysfunction and increased radiation sensitivity by impairing DNA damage repair. *Oncotarget* 7, 6074–6087. doi: 10.18632/oncotarget.6832

Karimi-Maleh H, Shojaei AF, Tabatabaeian K, Karimi F, Shakeri S, Moradi R. 2016. Simultaneous determination of 6-mercaptopruine, 6-thioguanine and dasatinib as three important anticancer drugs using nanostructure voltammetric sensor employing Pt/MWCNTs and 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluoro phosphate. *Biosensors and Bioelectronics*, 86, 879-884.

Kaushik V, Azad N, Yakisich JS, Iyer AKV. 2017. Antitumor effects of naturally occurring cardiac glycosides convallatoxin and peruvoside on human ER+ and triple-negative breast cancers. *Cell Death Discovery*, 3, 17009.

- Kaushik V, Yakisich JS, Azad N, Kulkarni Y, Venkatadri R, Wright C, Rojanasakul Y, Iyer AKV. 2017. Anti-Tumor Effects of Cardiac Glycosides on Human Lung Cancer Cells and Lung Tumorspheres. *Journal of cellular physiology*, 232(9), 2497-2507.
- Kim G, An HJ, Lee MJ, Song JY, Jeong JY, Lee JH, Jeong HC. 2016. Hsa-miR-1246 and hsa-miR-1290 are associated with stemness and invasiveness of non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*, 91, 15-22.
- Kinghorn AD, De Blanco EJC, Chai HB, Orjala J, Farnsworth NR, Soejarto DD, Oberlies NH, Wani MC, Kroll DJ, Pearce CJ. Swanson SM. 2009. Discovery of anticancer agents of diverse natural origin. *Pure and Applied Chemistry*, 81(6), 1051-1063.
- Kingston DG, Tamarkin L, Paciotti GF. 2012. Conformationally constrained and nanoparticle-targeted paclitaxels. *Pure and Applied Chemistry*, 84(6), 1455-1467.
- Kupchan SM, Dessertine AL, Blaylock BT, Bryan RF. 1974. Isolation and structural elucidation of allamandin, and antileukemic iridoid lactone from *Allamanda cathartica*. *The Journal of organic chemistry*, 39(17), 2477-2482.
- Kuper H, Boffetta P, Adami HO. 2002. Tobacco use and cancer causation: association by tumour type. *Journal of internal medicine*, 252(3), 206-224.
- Labrie F. 1993. Mechanism of action and pure antiandrogenic properties of flutamide. *Cancer*, 72(S12), 3816-3827.
- Langford SD, Boor PJ. 1996. Oleander toxicity: an examination of human and animal toxic exposures. *Toxicology*, 109(1), 1-13.
- Lee EW, Seo JH, Jeong MH, Lee SS, Song JW. 2012. The roles of FADD in extrinsic apoptosis and necroptosis. *BMB reports*, 45(9), 496-508.
- Lee HJ, Lee HJ, Magesh V, Nam D, Lee EO, Ahn KS, Jung MH, Ahn KS, Kim DK, Kim JY, Kim SH. 2008. Shikonin, acetylshikonin, and isobutyroylshikonin inhibit VEGF-induced angiogenesis and suppress tumor growth in lewis lung carcinoma-bearing mice. *Yakugaku Zasshi*, 128(11), 1681-1688.

- Liang CC, Park AY, Guan JL. 2007. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nature protocols*, 2(2), 329.
- Liao RG, Watanabe H, Meyerson M, Hammerman PS. 2012. Targeted therapy for squamous cell lung cancer. *Lung cancer management*, 1(4), 293-300.
- Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 2003. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nature Reviews Cancer*, 3(5), 330.
- Marchini JL, Heaton C, Ripley BD. fastICA: FastICA Algorithms to perform ICA and Projection Pursuit. R project. 2013. <https://CRAN.R-project.org/package=fastICA>.
- Masson O, Bach AS, Derocq D, Prébois C, Laurent-Matha V, Pattingre S, Liaudet-Coopman E. 2010. Pathophysiological functions of cathepsin D: Targeting its catalytic activity versus its protein binding activity?. *Biochimie*, 92(11), 1635-1643.
- Mattes WB, Hartley JA, Kohn KW. 1986. DNA sequence selectivity of guanine-N7 alkylation by nitrogen mustards. *Nucleic acids research*, 14(7), 2971-2987.
- Mendelsohn R, Balick MJ. 1995. The value of undiscovered pharmaceuticals in tropical forests. *Economic Botany*, 49(2), 223-228.
- Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L. 2004. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacological Reviews*. 56(2), 185–229.
- Misra MK, Sarwat M, Bhakuni P, Tuteja R, Tuteja N. 2009. Oxidative stress and ischemic myocardial syndromes. *Medical Science Monitor*, 15(10), RA209-RA219.
- Mohamed MM, Sloane BF. 2006. Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 6(10), 764.
- Mori K, Le Goff B, Charrier C, Battaglia S, Heymann D, Rédini F. 2007. DU145 human prostate cancer cells express functional receptor activator of NF κ B: new insights in the prostate cancer bone metastasis process. *Bone*, 40(4), 981-990.
- Mukhopadhyay S, Panda PK, Sinha N, Das DN, Bhutia SK. 2014. Autophagy and apoptosis: where do they meet?. *Apoptosis*, 19(4), 555-566.

- Nelson JA, Carpenter JW, Rose LM, Adamson DJ. 1975. Mechanisms of action of 6-thioguanine, 6-mercaptopurine, and 8-azaguanine. *Cancer Research*, 35(10), 2872-2878.
- Nesy EA, Mathew L. 2014. Detection and Quantification of Cardiotonic Drug Peruovoside Using HPTLC from *Thevetia neriifolia*, Juss Seed Extracts. *Int J Pharm Sci Invent*, 3, 11-6.
- Nitiss JL. 2009. Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy. *Nature Reviews Cancer*, 9(5), 338.
- Nobili S, Lippi D, Witort E, Donnini M, Bausi L, Mini E, Capaccioli S. 2009. Natural compounds for cancer treatment and prevention. *Pharmacological research*, 59(6), 365-378.
- Nurhanan MY, Asiah O, Ilham MM, Syarifah MS, Norhayati I, Sahira HL. 2008. Anti-proliferative activities of 32 Malaysian plant species in breast cancer cell lines. *Journal of Tropical Forest Science*, 77-81.
- Obasi IO, Nwachukwu N. 2013. Gestational iron deficiency and the related anaemia in northern zone of Ebonyi State. *Pak J Biol Sci*, 16(20), 1159-65.
- Oji O, Okafor QE. 2000. Toxicological studies on stem bark, leaf and seed kernel of yellow oleander (*Thevetia peruviana*). *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 14(2), 133-135.
- Omino EA, Kokwaro JO. 1993. Ethnobotany of Apocynaceae species in Kenya. *Journal of ethnopharmacology*, 40(3), 167-180.
- Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P. 2003. Calcium: Regulation of cell death: the calcium–apoptosis link. *Nature reviews Molecular cell biology*, 4(7), 552.
- Pao W, Miller V, Zakowski M, Doherty J, Politi K, Sarkaria I, Singh B, Heelan R, Rusch V, Fulton L, Mardis E. 2004. EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from “never smokers” and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(36), 13306-13311.

- Pathak S, Multani AS, Narayan S, Kumar V, Newman RA. 2000. AnvirzelTM, an extract of *Nerium oleander*, induces cell death in human but not murine cancer cells. *Anti-cancer drugs*, 11(6), 455-463.
- Plunkett W, Huang P, Xu YZ, Heinemann V, Grunewald R, Gandhi V. 1995. Gemcitabine: metabolism, mechanisms of action, and self-potential. In *Seminars in oncology* (Vol. 22, No. 4 Suppl 11, pp. 3-10).
- Pommier Y. 2006. Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. *Nature Reviews Cancer*, 6(10), 789.
- Rafehi H, Orlowski C, Georgiadis GT, Ververis K, El-Osta A, Karagiannis TC. 2011. Clonogenic assay: adherent cells. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (49).
- Rambaldi A, Grassi A, Masciulli A, Boschini C, Micò MC, Busca A, Bruno B, Cavattoni I, Santarone S, Raimondi R, Montanari M. 2015. Busulfan plus cyclophosphamide versus busulfan plus fludarabine as a preparative regimen for allogeneic haemopoietic stem-cell transplantation in patients with acute myeloid leukaemia: an open-label, multicentre, randomised, phase 3 trial. *The lancet oncology*, 16(15), 1525-1536.
- Rashan LJ, Franke K, Khine MM, Kelter G, Fiebig HH, Neumann J, Wessjohann LA. 2011. Characterization of the anticancer properties of monoglycosidic cardenolides isolated from *Nerium oleander* and *Streptocaulon tomentosum*. *Journal of ethnopharmacology*, 134(3), 781-788.
- Rudd GN, Hartley JA, Souhami RL. 1995. Persistence of cisplatin-induced DNA interstrand crosslinking in peripheral blood mononuclear cells from elderly and young individuals. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 35(4), 323-326.
- Sabeh F, Shimizu-Hirota R, Weiss SJ. 2009. Protease-dependent versus-independent cancer cell invasion programs: three-dimensional amoeboid movement revisited. *The Journal of cell biology*, 185(1), 11-19.
- Sarkar FH, Li Y, Wang Z, Kong D. 2009. Cellular signaling perturbation by natural products. *Cellular signalling*, 21(11), 1541-1547.

- Schoner W, Scheiner-Bobis G. 2007. Endogenous and exogenous cardiac glycosides: their roles in hypertension, salt metabolism, and cell growth. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 293(2), C509-C536.
- Seeka C, Sutthivaiyakit S. 2010. Cytotoxic cardenolides from the leaves of *Calotropis gigantea*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 58(5), 725-728.
- Sharifi R, Ratanawong C, Jung A, Wu Z, Browneller R, Lee M. 1997. Therapeutic effects of leuprorelin microspheres in prostate cancer. *Advanced drug delivery reviews*, 28(1), 121-138.
- Sharma P, Choudhary AS, Parashar P, Sharma MC, Dobhal MP. 2010. Chemical constituents of plants from the genus *Nerium*. *Chemistry & biodiversity*, 7(5), 1198-1207.
- Shedden K, Xie XT, Chandaroy P, Chang YT, Rosania GR. 2003. Expulsion of small molecules in vesicles shed by cancer cells: association with gene expression and chemosensitivity profiles. *Cancer research*, 63(15), 4331-4337.
- Shiau AK, Barstad D, Loria PM, Cheng L, Kushner PJ, Agard DA, Greene GL. 1998. The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen. *Cell*, 95(7), 927-937.
- Skehan P, Storeng R., Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren JT, Bokesch, H, Kenney S, Boyd MR, 1990. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 82(13), 1107-1112.
- Srivastava V, Negi AS, Kumar JK, Gupta MM, Khanuja SP. 2005. Plant-based anticancer molecules: a chemical and biological profile of some important leads. *Bioorganic y medicinal chemistry*, 13(21), 5892-5908.
- Stierle A, Strobel G, Stierle D. 1993. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. *Science*, 260(5105), 214-216.
- Strobel GA. 1998. Endophytic microbes embody pharmaceutical potential. *Asm News*, 5, 263-268.

- Strobel GA. 2002. Rainforest endophytes and bioactive products. *Critical reviews in biotechnology*, 22(4), 315-333.
- Strober W. 2015. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Current protocols in immunology*, 111(1), A3-B.
- Tacar O, Sriamornsak P, Dass CR. 2013. Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 65(2), 157-170.
- Tailler M, Senovilla L, Lainey E, Thepot S, Metivier D, Sebert M, Baud V, Billot K, Fenaux P, Galluzzi L, Boehrer S. 2012. Antineoplastic activity of ouabain and pyrithione zinc in acute myeloid leukemia. *Oncogene*, 31(30), 3536.
- Tian DM, Cheng HY, Jiang MM, Shen WZ, Tang JS, Yao XS. 2015. Cardiac Glycosides from the Seeds of *Thevetia peruviana*. *Journal of natural products*, 79(1), 38-50.
- Valster A, Tran NL, Nakada M, Berens ME, Chan AY, Symons M. 2005. Cell migration and invasion assays. *Methods*, 37(2), 208-215.
- van Meerloo J, Kaspers GJ, Cloos J. 2011. Cell sensitivity assays: the MTT assay. In *Cancer cell culture* (pp. 237-245). Humana Press.
- Wall ME, Wani MC. 1996. Camptothecin and taxol: from discovery to clinic. *Journal of ethnopharmacology*, 51(1-3), 239-254.
- Wang IK, Lin-Shiau SY, Lin JK. 1999. Induction of apoptosis by apigenin and related flavonoids through cytochrome c release and activation of caspase-9 and caspase-3 in leukaemia HL-60 cells. *European Journal of Cancer*, 35(10), 1517-1525.
- Wang Y, Lonard DM, Yu Y, Chow DC, Palzkill TG, Wang J, Qi R, Matzuk AJ, Song X, Madoux F, Hodder P. 2014. Bufalin is a potent small-molecule inhibitor of the steroid receptor coactivators SRC-3 and SRC-1. *Cancer research*.
- Wasik AM, Almestrand, S, Wang X, Hultenby K, Dackland ÅL, Andersson P, Kimby E, Christensson B, Sander B. 2011. WIN55, 212-2 induces cytoplasmic vacuolation in apoptosis-resistant MCL cells. *Cell death y disease*, 2(11), e225.

- Wen S, Chen Y, Lu Y, Wang Y, Ding L, Jiang M. 2016. Cardenolides from the Apocynaceae family and their anticancer activity. *Fitoterapia*, 112, 74-84.
- White E, DiPaola RS. 2009. The double-edged sword of autophagy modulation in cancer. *Clinical cancer research*, 1078-0432.
- Wilson FP, Berns JS. 2014. Tumor lysis syndrome: new challenges and recent advances. *Advances in chronic kidney disease*, 21(1), 18-26.
- Witz IP. 2008. The selectin–selectin ligand axis in tumor progression. *Cancer and Metastasis Reviews*, 27(1), 19-30.
- Wong SK, Lim YY, Abdullah NR, Nordin FJ. 2011. Assessment of antiproliferative and antiplasmodial activities of five selected Apocynaceae species. *BMC complementary and alternative medicine*, 11(1), 3.
- Woodson RE. 1930. Studies in the Apocynaceae. I. A Critical Study of the Apocynoideae (With Special Reference to the FGenus Apocynum). *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 17(1/2), 1-212.
- Woolley DW. 2013. A study of antimetabolites.
- World wide cancer statistics. Cancer Research UK. <http://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/worldwide-cancer>.
- Yarrow JC, Perlman ZE, Westwood NJ, Mitchison TJ. 2004. A high-throughput cell migration assay using scratch wound healing, a comparison of image-based readout methods. *BMC biotechnology*, 4(1), 21.
- Yi JM, Kim MS, Lee EH, Wi DH, Lee JK, Cho KH, Hong SH. Kim HM, 2003. Induction of apoptosis by Paljin-Hangahmdan on human leukemia cells. *Journal of ethnopharmacology*, 88(1), 79-83.
- Yue QX, Liu X, Guo DA. 2010. Microtubule-binding natural products for cancer therapy. *Planta medica*, 76(11), 1037-1043.
- Zhang H, Qian DZ, Tan YS, Lee K, Gao P, Ren YR, Rey S, Hammers H, Chang D, Pili R, Dang CV. 2008. Digoxin and other cardiac glycosides inhibit HIF-1 α synthesis and

block tumor growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(50), 19579-19586.

Zhao Q, Guo Y, Feng B, Li L, Huang C, Jiao B. 2011. Neriifolin from seeds of *Cerbera manghas* L. induces cell cycle arrest and apoptosis in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells. *Fitoterapia*, 82(5), 735-741.

11. RESUMEN BIOGRÁFICO

José Alberto Ramos Silva

Candidato para el grado de
Doctor en Ciencias con Orientación en Biotecnología

Tesis: Evaluación de la actividad anticáncer de *Thevetia peruviana*

Datos personales: Nacido en Monterrey, Nuevo León el 8 de septiembre de 1988, hijo de José Melchor Ramos Medellín y Lorena Silva Salazar.

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido de Químico Farmacéutico Biólogo con especialidad en el área de farmacia.

Dos Años de Maestría en ciencias bioquímicas, en el Instituto de Biotecnología de la UNAM.

Dentro de la misma maestría tomé un “Curso de Entrenamiento en Seguridad Radiológica” debido a que tuve que trabajar con el isótopo de Fósforo 32 (³²P).

Experiencia profesional: Farmacéutico en el área de sistemas clínicos para el hospital Christus Muguerza, fui el responsable de crear una base de datos para la farmacovigilancia de las dosis, contraindicaciones y reacciones medicamentosas. Durante mi estadía logré concluir con la construcción de la base y además estuve a cargo de la realización de pruebas hipotéticas para el mismo sistema.

RESEARCH ARTICLE

Open Access



Anticancer potential of *Thevetia peruviana* fruit methanolic extract

Alberto Ramos-Silva^{1†}, Faviola Tavares-Carreón^{1†}, Mario Figueroa², Susana De la Torre-Zavala¹, Argel Gastelum-Arellanez¹, Aída Rodríguez-García¹, Luis J. Galán-Wong¹ and Hamlet Avilés-Arnaut^{1*}

Abstract

Background: *Thevetia peruviana* (Pers.) K. Schum or *Cascabela peruviana* (L.) Lippold (commonly known as ayoyote, codo de fraile, lucky nut, or yellow oleander), native to Mexico and Central America, is a medicinal plant used traditionally to cure diseases like ulcers, scabies, hemorrhoids and dissolve tumors. The purpose of this study was to evaluate the cytotoxic, antiproliferative and apoptotic activity of methanolic extract of *T. peruviana* fruits on human cancer cell lines.

Methods: The cytotoxic activity of *T. peruviana* methanolic extract was carried out on human breast, colorectal, prostate and lung cancer cell lines and non-tumorigenic control cells (fibroblast and Vero), using the MTT assay. For proliferation and motility, clonogenic and wound-healing assays were performed. Morphological alterations were monitored by trypan blue exclusion, as well as DNA fragmentation and AO/EB double staining was performed to evaluate apoptosis. The extract was separated using flash chromatography, and the resulting fractions were evaluated on colorectal cancer cells for their cytotoxic activity. The active fractions were further analyzed through mass spectrometry.

Results: The *T. peruviana* methanolic extract exhibited cytotoxic activity on four human cancer cell lines: prostate, breast, colorectal and lung, with values of IC_{50} 1.91 ± 0.76 , 5.78 ± 2.12 , 6.30 ± 4.45 and 12.04 ± 3.43 μ g/mL, respectively. The extract caused a significant reduction of cell motility and colony formation on all evaluated cancer cell lines. In addition, morphological examination displayed cell size reduction, membrane blebbing and detachment of cells, compared to non-treated cancer cell lines. The *T. peruviana* extract induced apoptotic cell death, which was confirmed by DNA fragmentation and AO/EB double staining. Fractions 4 and 5 showed the most effective cytotoxic activity and their MS analysis revealed the presence of the secondary metabolites: thevetiaflavone and cardiac glycosides.

Conclusion: *T. peruviana* extract has potential as natural anti-cancer product with critical effects in the proliferation, motility, and adhesion of human breast and colorectal cancer cells, and apoptosis induction in human prostate and lung cancer cell lines, with minimal effects on non-tumorigenic cell lines.

Keywords: Cytotoxic activity, Anti-proliferative activity, Motility, Apoptosis, Human cancer cells, Flavonoid, Cardiac glycosides

Background

Cancer is one of the most important causes of death worldwide. In 2012, 8.2 million cancer-related deaths were reported and the number of new cases is expected to rise by about 70% over the next two decades [1]. Cancer is characterized by the uncontrolled and invasive

growth of cells. The most peculiar feature of cancer cells is their ability to metastasize to other specific organs. For example, prostate and colon cancer metastasize to bones and liver, respectively; lung cancer cells spread to adrenal glands, liver, brain, and bones, while breast cancer cells metastasize to lungs and bones [2]. For the most important adenocarcinomas, such as lung, breast, or colorectal cancer, the treatment is barely effective, due to metastatic disease responding only transiently to conventional treatments [3]. Therefore, scientists are still utilizing

* Correspondence: hamlet.avilesarn@uanl.edu.mx

†Equal contributors

¹Instituto de Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, Avenida Universidad S/N, Ciudad Universitaria, CP 66455 San Nicolás de los Garza, NL, Mexico

Full list of author information is available at the end of the article



new alternatives in attempts to find novel compounds and strategies for the treatment of this disease [4].

Plants are a valuable source of new biologically active molecules due to the presence of hundreds of biologically active components [5]. One of the plant families i.e., Apocynaceae, is well-known for anticancer activities, mainly in the genera of *Catharanthus*, *Nerium*, *Strophanthus*, *Apocynum* and *Thevetia* [6]. *Thevetia peruviana* (Pers.) K. Schum, also known as *Cascabela peruviana* (L.) Lippold, yellow oleander or lucky nut in the West Indies, shows a diverse array of properties ranging from being a cardiotoxic to a toxin. *T. peruviana* plant has been used traditionally for the treatment of gastrointestinal and inflammatory diseases, heart failures and skin tumors [7, 8]. All parts of the plant are poisonous due to the presence of cardiac toxins, but the fruit of *T. peruviana*, is the most toxic part of the plant because it has the highest and diverse content of cardiac glycosides. There are many known cases of intentional and accidental poisoning of humans through ingestion of fruits and leaves [9]. Whereas about 10 fruits consumed may be fatal for an adult, a single fruit may be lethal for a child. The common clinical set of symptoms resembles digitalis poisoning with marked nausea, vomiting, abdominal pain, diarrhea, dysrhythmias, and hyperkalemia [10]. Although the anticancer potential of parts of *T. peruviana* plant, such as leaves, bark and seeds has been evaluated against human gastric and pancreatic cancer cell lines [11], the anticancer potential of *T. peruviana* fruit is still unknown because only a few cardiac glycosides have been identified and examined as cytotoxic agents. Therefore, the *T. peruviana* fruit extract has been investigated in this study to explore its anticancer potential against the most common cancer types (lung, breast, prostate and colorectal), in terms of morphological analysis, motility and cell adhesive properties, DNA damage and induction of apoptosis in human cancer cell lines.

Methods

A *T. peruviana* plant specimen was collected in San Nicolás de los Garza, N.L., México (25°43'59.57"N, 100°16'4.75"W). Botanical authentication of the material was performed by the Botany Department Staff of Facultad de Ciencias Biológicas, UANL. A specimen of *T. peruviana* was recently deposited in the Herbarium of the Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León (voucher UNL-028732).

Extraction and preparation of plant samples for testing

The plant extracts were obtained from samples (20 g) of dried roots, leaves, or aerial parts through maceration with methanol (3 × 300 mL) at room temperature for 24 h and under continuous shaking. The methanolic extracts were filtered and evaporated under reduced pressure using a rotary evaporator (Yamato RE801). Samples

were stored at -20 °C prior to further experiments. For the cytotoxicity assays, the dried methanol extract was dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO) in order to obtain a final concentration of 100 mg/mL (stock) and diluted in PBS (phosphate buffer saline). DMSO concentration in the culture medium was less than 0.1%. Doxorubicin (10 µg/mL, Zytokil) treated cells and untreated cells were used as positive control and negative control, respectively. The methanolic extract of *T. peruviana* was fractionated by column chromatography. Briefly, 1.5 g of fruit extract was adsorbed onto Celite 545 and subjected to reverse flash chromatography on a 50 g RediSep Rf Gold HP C₁₈ column, eluting with 10:90 MeOH-H₂O for 4 CV. Then a linear gradient from 10:90 MeOH-H₂O to 100% MeOH for 25 CV, holding 100% MeOH for 8 CV, at a flow rate of 40 mL/min to give 120 fractions each containing 12 mL. The resulting fractions were then pooled according to their ELSD and UV profiles, which resulted in six combined fractions in total. All fractions were examined by UPLC-PDA-HRMS-MS/MS and tested for cytotoxic activity against human prostate carcinoma cell line (HTB-81) by the MTT colorimetric assay.

Cell lines and cell culture

The cancer cell lines used in this study were human colorectal adenocarcinoma (HTB-38), lung carcinoma (HTB-177), prostate adenocarcinoma (HTB-81), and breast adenocarcinoma (HTB-22), whereas the normal cell lines used were human skin fibroblast (CCL-116) and Vero cell line (CCL-81). Cell lines were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC). Cell lines were cultured in DMEM or RPMI (only for HTB-81) supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (Byproductos). All cells were cultured at 37 °C under a humidified atmosphere containing 5% CO₂.

Cytotoxicity assay

For the cytotoxicity assay, 5×10^4 – 6×10^4 cells for colorectal, lung, breast, prostate cancer cells, and normal cells were seeded in 96-well tissue culture plates. When the cells had reached 75% confluence, they were incubated using the methanol extracts at various concentrations. After 24 h of incubation, the cytotoxicity was assessed using the MTT assay as described previously [12]. To obtain the half maximal inhibitory concentration (IC₅₀), the percentages of cell viability and growth inhibition were calculated according to the following equations [13]. Cell viability (%) = [(OD of treated cells-OD of blank)/(OD of control-OD of blank)] × 100. Growth inhibition (%) = 100 - Cell viability (%). All determinations were performed five times independently with three technical replicates.

Clonogenic assay of cell in vitro

The clonogenic assay was carried out as previously described [14]. 100–130 cells/well and incubated for 24 h at 37 °C with 5% CO₂ to lead attach. The cells were treated with the corresponding IC₅₀ for 24 h and were cultured for 7–14 additional days. Then, the cultures were stained with 0.5% crystal violet for 30 min. Colonies containing more than 50 cells (after 10–14 days of incubation) were counted using ImageJ software [15]. Three independent experiments were performed with three technical replicates each one.

Wound and healing assay

Wound and healing assay was carried out as previously described [16]. 5×10^4 – 6×10^5 cells were seeded and grown overnight to reach 100% confluency. The monolayer was treated with the corresponding IC₅₀ for 24 h. The cells were migrated into the scratched area and photographed (camera infinity 1–2, Lumenera Corp., CA) every 24 h. The migrated cells were expressed as a mean value per field. Three independent experiments were performed with three technical replicates each one.

Cell morphology and membrane permeability assays

Cells were seeded in a 96-well plate for 24 h. After attachment, the cells were treated with *T. peruviana* fruit extract using the IC₅₀ concentration for 4, 8, 16 and 24 h. For cell morphology, the cells were observed using an inverted microscope (Olympus IX71). Trypan blue assay was used for the permeability assay (0.4% trypan blue/per well) [17]. As a negative control, cells were cultivated in the same plate without the plant extract. Each sample was observed under the microscope and photographs were taken immediately after staining. Three independent experiments were performed with three technical replicates.

DNA fragmentation analysis

DNA fragmentation was carried out as described previously [18]. Cells were grown in the presence or absence of *T. peruviana* fruit extract using the IC₅₀ concentration for 24 h. Doxorubicin treated cells were used as positive control. Briefly, 5×10^5 cells were lysed in DNA lysis buffer [1 M Tris-HCl (pH 8.0), 0.5 M EDTA, 100% Triton X-100, 2% SDS, 0.2 M NaCl], and then, DNA was extracted. The nucleic acid concentration and purity were measured using a NanoDrop® ND-2000 spectrophotometer (Thermo Scientific). Equal amounts of DNA (10 µg/well) were electrophoresed in 1% agarose gel. DNA fragments were visualized using an UV transilluminator (MutilDoc-it Digital Imaging System UVP). Three independent experiments were performed.

Dual acridine orange/ethidium bromide (AO/EB) fluorescent staining

For the AO/EB method, 5×10^5 cells were seeded in a 6-well plate. Cells were treated with *T. peruviana* fruit extract at the corresponding IC₅₀ concentration for 4 h. Then cells were subjected to AO/EB staining as described previously [19]. Briefly, cells were trypsinized and re-suspended in cold PBS and AO/EB dye mix (100 µg/mL AO and 100 µg/mL EB; Sigma) was added. Stained cell suspensions (10 µL) were viewed and counted using a Nikon eclipse TS100 inverted microscope at 40× magnification with excitation filter 480/30 nm and barrier filter 535/40 nm. Six fields per sample were examined. The AO/EB staining method was repeated 3 times.

Liquid chromatography - Mass spectrometry analysis

HRESIMS data were collected and in positive and negative ionization modes using a Thermo QExactive Plus mass spectrometer (ThermoFisher) equipped an electrospray ionization (ESI) source and via an Acquity UPLC system (Waters Corp). The higher-energy collisional dissociation (HCD) cell used a normalized collision energy of 30 eV for all the compounds to obtain MS/MS data. The UPLC separation was performed using an Acquity BEH C₁₈ column equilibrated at 40 °C and a flow rate set at 0.3 mL/min. The mobile phase consisted of 15% CH₃CN–H₂O (0.1% formic acid) for 0.5 min, and then a linear gradient from 15% CH₃CN to 100% CH₃CN over 6 min, and 1 min holding 100% CH₃CN before returning to the starting conditions. Samples were dissolved in MS grade methanol and filtered through a 0.2 µm Acrodisc (Waters) filter. Tentative metabolite identification was performed by comparison of HRMS data, UV maxima and fragmentation patterns (MS/MS data) with those contained in the Dictionary of Natural Products [20] reference compounds refined for *Thevetia* plant metabolites.

Data Analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 7 software. The *p*-value was analyzed in comparison to the untreated samples using Student's *t*-Test or using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Tukey test for comparison between different treatment groups. Differences were considered statistically significant at *p* < 0.05. Results were expressed as mean ± SEM of data obtained from tripled or quintuplet, independent experiments. Multivariate analysis was performed using the R 3.2.5 environment. Three biological replicates for each cell line were evaluated, and the variables used were the IC₅₀, the clonogenic assay (CL), the membrane permeability (MP) and the wound-healing assay (WH). A standardized principal component analysis (PCA) was performed with “ade4” package [21], followed by an independent component analysis (ICA) applied to the PCA patterns [22].

Results

Cytotoxic activity of *T. peruviana* fruit methanol extract on human prostate, breast, colorectal, and lung cancer cell lines

In order to assess the cytotoxic effect of the *T. peruviana* methanol extract on breast (HTB-22), colorectal (HTB-38), prostate (HTB-81), and lung (HTB-177) cancer cell lines, a MTT assay was performed. IC₅₀ values indicate the concentration of the extract that inhibits the growth of 50% of the cell population. The criteria of cytotoxicity established by the U.S. National Cancer Institute (NCI) considers a crude extract as active, moderately active, or inactive, when the IC₅₀ values are lower than 20 µg/mL, from 20 to 100 µg/mL, or higher than 100 µg/mL, respectively [23]. *T. peruviana* methanol fruit extract induced strong cytotoxicity in all four cancer cell lines (<20 µg/mL), but prostate cancer cells showed the lowest IC₅₀ after treatment with *T. peruviana* extract (IC₅₀, 1.91 ± 0.76 µg/mL; Table 1). In contrast, the methanol extract of *T. peruviana* exhibited moderate activity against Vero cells and it was inactive against fibroblast cell line (Table 1). Accordingly, the *T. peruviana* fruit extract is cytotoxic to human cancer cell lines, but moderately active on Vero cells and inactive on healthy human fibroblast cells.

T. peruviana fruit methanol extract inhibits the proliferative ability of four human cancer cell lines

The effect of the *T. peruviana* extract on colony forming ability in four cancer cell lines was investigated. Clonogenic assay was carried out to assess the differences in reproductive viability between treated and untreated cells with *T. peruviana* extract. One hundred cancer cells were seeded in the presence or absence of *T. peruviana* extract, and after 10–15 days of incubation, the colonies formed were counted. The number of colonies observed was significantly inhibited by the *T. peruviana* extract (Fig. 1a). Colony forming ability was reduced by 80% in the breast and prostate cancer cells, while colorectal and lung cancer cells were reduced by 70% (Fig. 1b). In contrast, no defect in proliferation ability was observed for normal cell lines (Fig. 1a, b). Positive control (doxorubicin) inhibited the colony forming ability of both cancer and normal cell lines (Additional file 1: Figure S1). These results suggest that the *T. peruviana* fruit extract has strong anti-proliferative

activity against different types of cancer cells without displaying alterations on normal cell lines.

T. peruviana fruit extract affects the cell motility of human cancer cell lines

The effect of the *T. peruviana* fruit extract on cell motility was researched using a wound-healing assay. Cancer cells were evaluated in the presence or absence of the plant extract, monitoring until the induced wound was completely closed. Untreated cells exhibited complete wound closure at 24, 48, 96, and 144 h for the human prostate, breast, lung, and colorectal cancer cell lines, respectively. In contrast, all cancer cell lines evaluated showed a dramatic inhibition of wound closure when treated with the *T. peruviana* extract. The wound closure of Vero and fibroblast cells was achieved at 48 h, whether exposed to the fruit extract or not (Additional file 2: Figure S2). As a positive control, doxorubicin was used in wound-healing assay and showed an increase in the wound due to strong detachment of both the human cancer and normal cell lines (Additional file 3: Figure S3). These results indicated that the *T. peruviana* fruit extract inhibited and delayed the migration of four different human cancer cells *in vitro*.

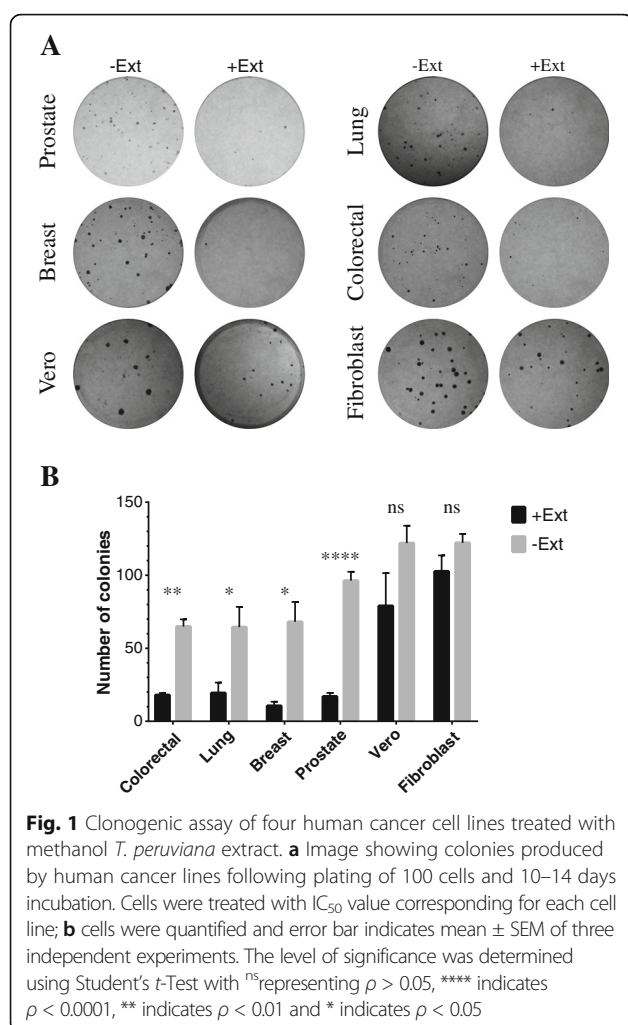
Morphological changes in four human cancer cell lines exposed to *T. peruviana* extract

All the human cell lines displayed significant morphological changes when treated with *T. peruviana* fruit extract for 24 h (Fig. 2). Thus, we checked whether changes in cell morphology occurred during the incubation of the cells with media containing plant extract. Morphological changes of human cancer cells treated with plant extract were monitored up to 24 h. At 8 h of incubation, some cells were rounded up in the prostate, lung, and breast cancer cells. After 16 h of treatment, the cells had shrunk and showed disrupted intercellular contacts. In some cases, the cells were bi-nucleated and the majority of the cells were detached from the wells, denoting cell death. These changes were more drastic for the prostate, breast, and lung cancer cell lines than for colorectal cells and the most prominent effect in the latter was membrane blebbing (small protrusions of the membrane). Because cells did not show vacuolation in the cytoplasm, we considered that autophagy is not involved in the mechanism of cell death [24]. To highlight,

Table 1 IC₅₀ values of *T. peruviana* fruit extract on prostate, lung, colorectal and breast cancer cell lines

IC ₅₀ (µg/mL) ± SEM					
Cancer cell lines				Normal cell lines	
Prostate	Breast	Colorectal	Lung	Vero	Fibroblast
1.91 ± 0.76 ^a	5.78 ± 2.12 ^a	6.30 ± 4.45 ^a	12.04 ± 3.43 ^a	57.02 ± 14.8 ^b	1578 ± 301 ^c

Human cancer cell lines were treated with different concentrations of *T. peruviana* fruit extract in 96-well microcultured plates for 24 h. IC₅₀ values are expressed as mean ± standard error of mean (S.E.M) of quintuplicate determinations. Different letters represent statistically significant differences determined by one way ANOVA ($p < 0.05$), followed by Tukey's multiple comparison test



normal cell lines showed no evident morphology alteration during the 24 h of treatment with *T. peruviana* fruit extract. When control treatment with doxorubicin was applied, cell morphology was altered in both human cancer and normal cells (Additional file 4: Figure S4). These results indicated that after 8 h of exposure to the *T. peruviana* extract, the cancer cells presented significant morphological alterations without any observed change in the healthy cell lines.

T. peruviana extract affects the viability of human cancer cells in a time-dependent manner

To determine whether the viability of the human cancer cells is affected during treatment with *T. peruviana* extract, the trypan blue exclusion test was used. Loss of the integrity of plasma membrane can be verified using polar dyes, such as trypan blue, which is excluded by an intact membrane. We observed that the number of dead cells increased in a time-dependent manner in the presence of the extract plant. The effect of the *T. peruviana* extract on cell viability of the breast and prostate cancer cells was 50–60% viability after 8 h of treatment,

whereas the lung and colorectal cancer cells had 80% viability after 8 h. After 24 h, the lung, prostate, and breast cancer cells showed viability decreased to below 25% (Fig. 3). Interestingly, the colorectal cancer cells were less sensitive to plant extract showing 70% of viability after 24 h treatment. Vero and fibroblast cells showed a small decrement or none at all in viability during the treatment with the *T. peruviana* fruit extract. This result confirms that *T. peruviana* extract has a cytotoxic effect (at the level of membrane integrity) on different types of cancer cells whereas the normal fibroblast cells were not affected.

Motility and membrane permeability features are mainly affected by *T. peruviana* fruit extract

Multivariate analysis was performed on the six cell lines (four tumoral and two normal), using as variables to be evaluated: the IC_{50} value, the clonogenic assay, the wound healing assay, and membrane permeability. PCA was applied to the whole dataset and the first 3 principal components (PC's) accounted for 97.3% of the observed variability. Assuming that directions with the greatest variance are the most biologically relevant, these leading PC's were selected as those with the major structure or variance, as a de-noising step enhancing ICA results. ICA obtained 3 independent components (IC1, IC2 and IC3) with negative kurtosis (−1.62, −1.42 and −0.12, respectively). The employment of these components, plotting IC1 and IC2, allowed the effective separation of samples into their original groups (Fig. 4). With this, ICA was able to distinguish between the sensitivity of normal (right side) and cancer cells (left side) exposed to *T. peruviana* extract (with colorectal cancer cell between both populations). The IC1 clearly separates tumor cells from normal cells, mainly due to the effect of the extract on cell motility (wound healing assay) and the membrane permeability, while the IC2 separates samples mainly on the basis of the IC_{50} observed for each cell line. The anti-proliferative (clonogenic assay) response of the cell lines to the extract is mainly represented by the IC3, which can be observed in the Additional file 5: Figure S5. Overall, this analysis identified that the main features affected by the *T. peruviana* extract were cell motility and membrane permeability and, less significantly, the IC_{50} and anti-proliferative activity.

T. peruviana fruit extract induces DNA fragmentation in four types of human cancer cells

The detection of the DNA fragmentation is a common hallmark of cells undergoing late-stage apoptosis [25]. In order to determine if *T. peruviana* fruit extract could induce DNA fragmentation and thus whether apoptosis occurred, human cancer cells exposed to *T. peruviana* treatment were assessed for DNA laddering and visualized

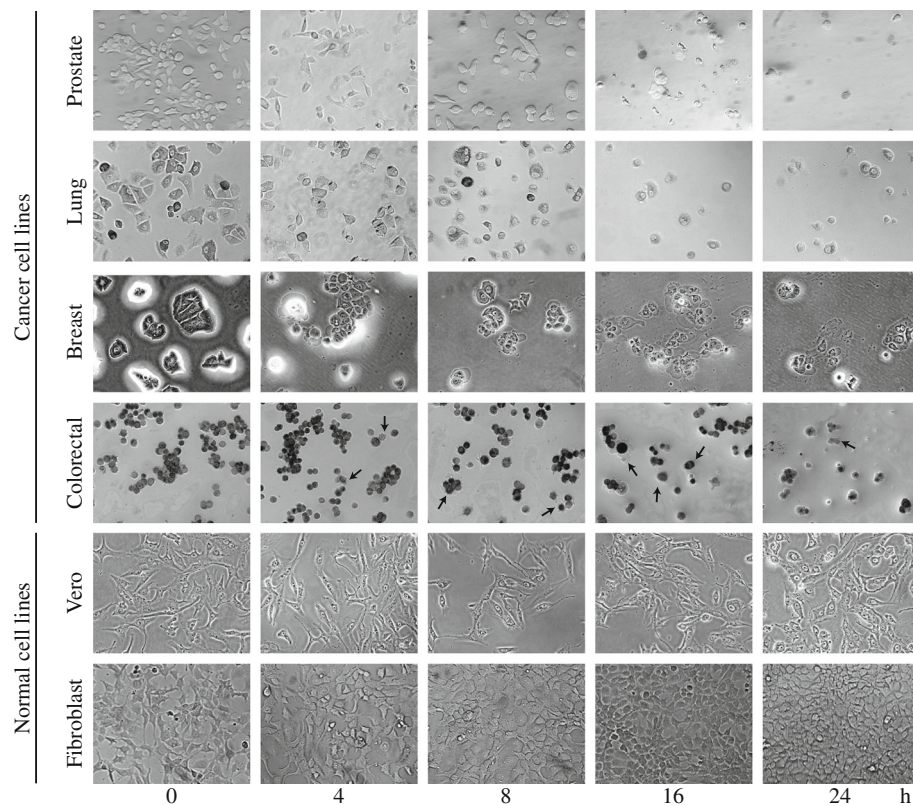


Fig. 2 Morphological changes on four human cancer cell lines during treatment with *T. peruviana* methanol extract. Human cancer cells were treated at IC_{50} corresponding value for each cell line and monitored over a period of 24 h. Black arrows indicated blebbing membranes

by agarose gel electrophoresis (Fig 5). It was found that the four human cancer cell lines incubated with *T. peruviana* extract showed apoptotic DNA fragmentation profiles similar to the positive control, doxorubicin, which is known to induces apoptosis [26]. No nucleic acid fragmentation was observed in untreated cells. Normal cell lines showed a lower degree of DNA fragmentation compared with cancer cell lines.

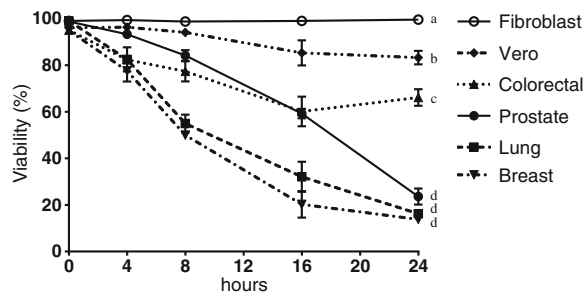
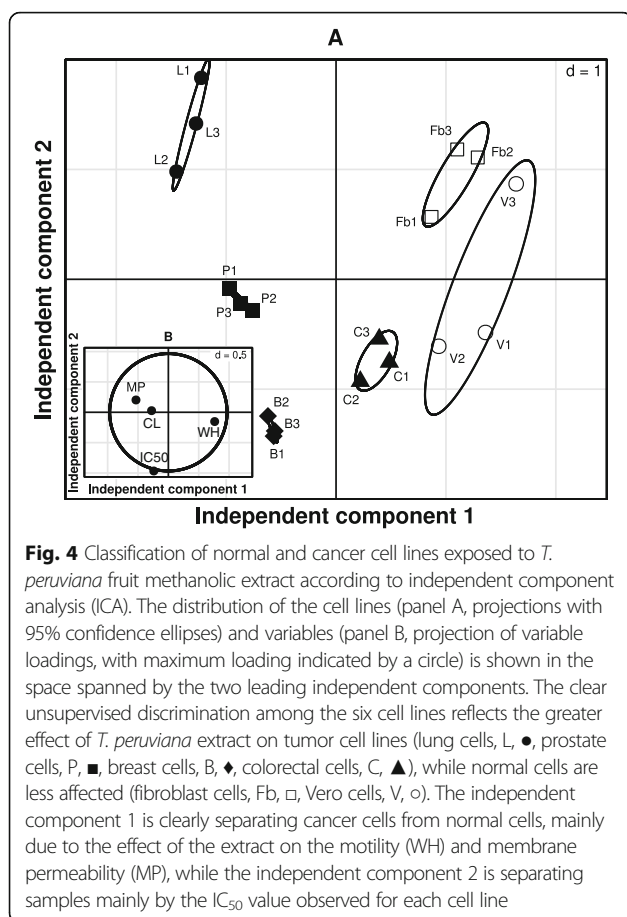


Fig. 3 Viability of four human cancer cells exposed to *T. peruviana* methanol extract over a period of 24 h. Human cancer cells were treated at IC_{50} value corresponding for each cell line. Cell viability was evaluated using the trypan blue exclusion method. Each data point represents values from three independent experiments ($n = 3$). Error bar indicates mean \pm SEM. Different letters represent statistically significant differences determined by one way ANOVA ($p < 0.05$)

Apoptosis induction by *T. peruviana* fruit extract on human lung and prostate cancer cells

It was observed that *T. peruviana* extract triggered morphological changes and DNA fragmentation in a time-dependent manner that could be related to apoptosis. To determine and quantify cell death, acridine orange/ethidium bromide (AO/EB) fluorescent staining was used to identify apoptosis-associated changes in the cell membrane. AO is a membrane-permeable dye that binds to the nucleic acids of viable cells. EB is an impermeable dye, but readily penetrates the membrane of nonviable cells and binds to DNA. When AO/EB are used simultaneously, viable cells fluoresce green and nonviable cells fluoresce red under fluorescence microscopy. Lung and prostate cells were labeled by AO/EB after 4 h of treatment with the *T. peruviana* extract, and dual staining was examined under a fluorescent microscope. Early and late-stage apoptotic cells, marked by crescent-shaped or granular yellow-green AO nuclear staining (as indicated by condensed or fragmented chromatin) were detected in the treated group (with *T. peruviana* extract) and the positive control (doxorubicin treated) (Fig. 6a). Also, dead cells from direct necrosis were detected, having an orange nucleus. No significant apoptosis was detected in the negative control group (untreated cells), which



showed a normal green nucleus. Quantification of the live, apoptotic, and necrotic cell populations in the control and treated human prostate and lung cancer cells indicated that after 4 h of treatment, the prostate and lung cancer cells increased the early apoptosis stage by 40.65% and 41.51%, respectively (Fig. 6b). Thus, in accordance with our DNA fragmentation results, the *T. peruviana* fruit extract triggers apoptosis.

Metabolic profiling of *T. peruviana* fractions by LC-MS analysis

Methanol extract of *T. peruviana* fruit was subjected to flash chromatography and six fractions were obtained. Because prostate cancer cells showed the lowest IC₅₀ to *T. peruviana* crude extract compared to lung, breast, and colorectal cancer cells, every single fraction was analyzed on the prostate cancer cell line by MTT assay, fractions four and five being the most significantly cytotoxic (Table 2). Those fractions were analyzed using UPLC-PDA coupled with a HRESIMS-MS/MS spectrometer. Each peak contained in the fractions was dereplicated for their UV profile, HRMS data in both positive and negative modes, and for its MS/MS fragmentation pattern against a refined subset of plant metabolites of *Thevetia* species contained in the Dictionary of Natural Products (286,310 compounds contained in the database). The results showed that these fractions contained the polyketide thevetiaflavone and the cardiac glycosides: peruvosidic acid, peruvoside, thevefoline, solanoside, neriifoside and neriifolin.

Discussion

T. peruviana belongs to the Apocynaceae family, a plant which is native to central and southern Mexico, as well as Central America. It is a medicinal plant used to treat different diseases, including cancer [27]. The leaves of yellow oleander had previously been studied and shown to possess antimicrobial, antifungal, antidiarrheal, insecticide, molluscicide, and rodenticide activity [8, 28–30]. However, scientific evidence to demonstrate mode of action, targets and agents responsible for the bioactivity in the fruit is still needed. The purpose of the present study was to find out the cytotoxic and anti-proliferative activity of methanol extracted fruit of *T. peruviana* on different types of human cancer cell lines.

Our experiments in vitro showed that *T. peruviana* fruit extract exhibited strong cytotoxicity against four cancer cell lines. Among the cell lines examined, lung cells showed higher IC₅₀ value (12.04 µg/mL) than

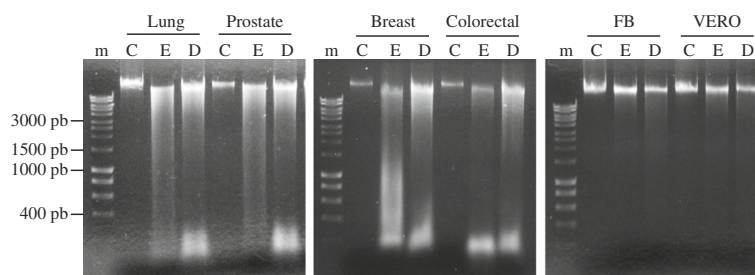
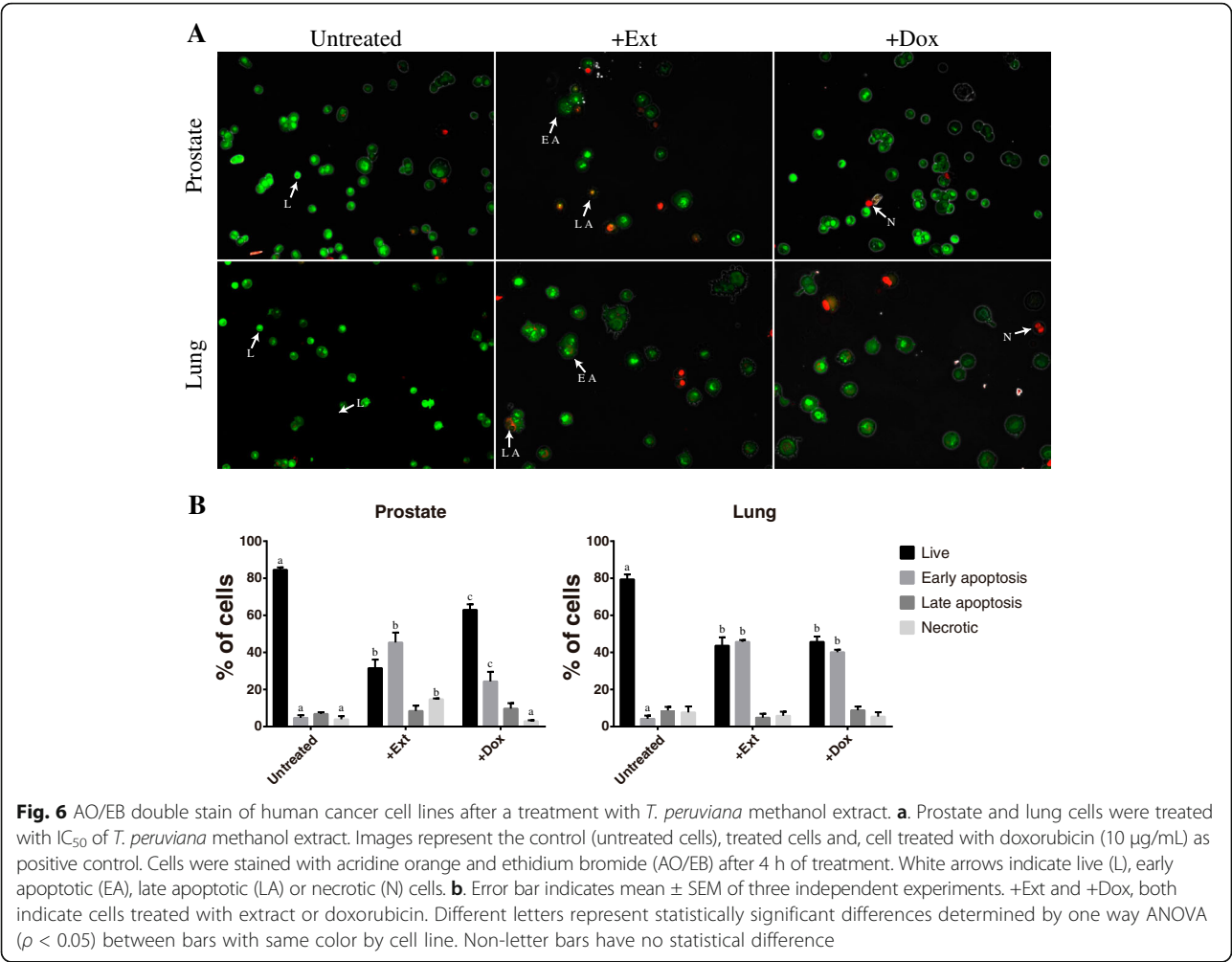


Fig. 5 DNA fragmentation of human cancer cell lines treated with *T. peruviana* methanol extract. Lung, prostate, breast and colorectal cancer cell lines were treated with the corresponding IC₅₀ value for each cell line during a 24 h period; m, molecular-weight marker; C, untreated control; E, cancer cell line treated with *T. peruviana* methanol extract at its corresponding IC₅₀ value and, D, cancer cell line treated with doxorubicin (10 µg/mL). Representative result from three independent experiments is shown



prostate (1.91 $\mu\text{g/mL}$), breast (5.78 $\mu\text{g/mL}$), and colorectal (6.30 $\mu\text{g/mL}$) cells. Such variation among the cell lines might be attributed in part to the fact that cancer cells possess differences in their genetic make up, morphology and doubling time, resulting in differential susceptibility to the same cytotoxic agent [31]. Our results, together with previously reported toxic activity, suggest that *T.*

Table 2 Cell viability of the fractions of *T. peruviana* fruit extract on prostate cancer cell line (HTB-81)

Fraction	% Viability
1	116 \pm 3.7 ^a
2	121 \pm 5 ^a
3	103 \pm 4 ^a
4	3.71 \pm 3.4 ^b
5	1.24 \pm 1.9 ^b
6	62 \pm 3 ^c

The fractions were obtained by flash chromatography. Viability was determined by MTT assay, values being expressed as mean \pm SEM of triplicate determinations. Different letters represent statistically significant differences determined by one way ANOVA ($p < 0.05$), followed by Tukey's multiple comparison test

peruviana fruit methanol extract has an antiproliferative potential.

Cancer is a complex disease characterized by proliferation of highly resistant cells to death. An increased rate of cellular proliferation is frequent, due to the fact that most cancer cells divide more often than normal cells. The goal of targeting cell proliferation is to arrest the cell cycle or induce cancer cell death using cytotoxic compounds. We show here, that *T. peruviana* fruit extract significantly reduced the cell viability and the ability of cells to form colonies in four different human cancer cell lines. The clonogenic assay has been used to detect cells that have retained their capacity to produce a large number of progeny after radiation and chemotherapy treatments [32]. It also correlates tumorigenicity analysis in vivo and predicts the clinical response toward several agents in breast cancer patients [33]. Hence, our results in clonogenic assay suggest that *T. peruviana* fruit extract has potential anticancer activity, limiting proliferation of cancer cells after treatment. Notably, normal cells (vero and fibroblast) treated with

T. peruviana extract did not show any observable effect in clonogenic assay.

Migration is a critical step in initial progression of cancer that facilitates metastasis. Wound and healing assay is a classic and common method used for discovery and validation of molecules that affect cell migration [16, 34] and metastasis [35]. The methanolic *T. peruviana* fruit extract inhibited and delayed the cell migration of cancer cells, but not among normal cells. These results open the door to further studies that could confirm if the cytotoxic activity of *T. peruviana* fruit extract alters the regulation of the actin cytoskeleton, induces morphological changes and leads to detachment of cells, culminating in cell death. Moreover, motility and membrane permeability features were mainly affected by *T. peruviana* fruit extract, according with the multivariate analysis performed on the six cell lines and the four variables evaluated, suggesting a potential antimetastatic activity in the *T. peruviana* fruit extract.

One crucial and desirable mechanism by which chemotherapeutics destroy tumor cells is by inducing apoptosis. Cells undergoing apoptosis show morphological and biochemical modifications including chromatin segregation, nuclear condensation, DNA fragmentation, partition of the membrane, and vesicles formation [36, 37]. The late-stage of apoptosis can be visualized by standard agarose gel electrophoresis as a ladder pattern due to DNA cleavage [38], while both (the early and late stages of apoptosis) can be determined by AO/EB fluorescent staining. *Cerbera manghas*, a plant belonging to the Apocynaceae family, contains a cardiac glycoside (neriifolin), which induced DNA fragmentation on hepatocellular carcinoma 48 h after treatment [39]. Here, crude extract from *T. peruviana* fruit showed death induction on cancer cell lines through early apoptosis mechanisms (AO/EB fluorescent staining) 4 h after treatment and late-stage apoptosis (DNA laddering assay) after 24 h of treatment. This result indicates that *T. peruviana* could have a higher level of apoptotic activity than other members of the Apocynaceae family. In addition, it will be important to determine whether the apoptotic activity is located in the compounds present in the flesh or seeds.

Mass spectrometry analysis of active fractions from *T. peruviana* fruit methanol extract indicated that one flavonoid and cardiac glycosides are secondary metabolites present in the fruit plant. Flavonoids, such as curcumin, quercetin and genistein, are known to have cell line-specific anti-proliferative and apoptosis inducing activity [40–42]. It has been postulated that flavonoids possess anticancer properties manifested through several mechanisms, including decrease of reactive oxygen species, inhibition of DNA topoisomerase and downward regulation pathway of nuclear transcription factors [43–46]. Further experiments are required to determine the cytotoxic effect

of thevetiaflavone and individual cardiac glycosides present in the methanolic fruit extract of *T. peruviana* on human cancer cell lines. Recent investigations of seeds from *T. peruviana* resulted in the isolation of cardiac glycosides that had inhibitory effects against human gastric and pancreatic cancer cell lines [11]. Cardiac glycosides are the most researched secondary metabolites in *T. peruviana* due to the fact they can heal heart pathologies [47], but are also being studied for their cytotoxic and/or apoptotic activities against myeloid leukemia (peruvoside) [48] and hepatocellular carcinoma (neriifolin) [39]. Thevetin and peruvoside are cardiac glycosides which are clinically important constituents due to be used in treatment of arrhythmias [49]. One hundred nine cardenolides have been isolated and identified from members of the Apocynaceae family, and about a quarter of them are reported to have anticancer activity. Cardenolides are well known as the substrates of $\text{Na}^+/\text{K}^+ - \text{ATPase}$, which is an enzyme that regulate various cell survival and death signal pathways [6] and its relative distribution and expression are distinct in cancer cells compared with normal ones, indicating that they could serve as a novel target with great potential. This could be the reason that multivariate analysis showed an adequate separation between normal and cancer cells, revealing significant differences in their sensitivity to the toxic compounds in the *T. peruviana* fruit methanolic extract, mainly due to the effect of the extract on the motility and membrane permeability on human prostate, breast, colorectal and lung cancer cell lines. The cytotoxic activity of crude extract from *T. peruviana* fruit could be attributed to their phytochemical components such as thevetin A, thevetin B, peruvoside, thevenerin, and cerberin, which are toxins [50], and also to the cardiac glycosides found in active fractions reported in this study (thevefoline, solanoside, neriifoside, peruvoside and neriifolin). Finally, the isolation of the active principles of the methanolic extract of *T. peruviana* fruit is currently being undertaken to investigate their cytotoxic, molecular and genetic action mechanisms, which could provide meaningful perspectives for biomedical and biotechnological research.

Conclusions

The current study presents evidence that the methanol extract of *T. peruviana* fruit inhibits cell proliferation, has a time-dependent cytotoxic activity and induces apoptosis of human cancer cell lines, but has minimal or less pronounced effects on normal cells. The fruit extract displayed anticancer properties mainly through mechanisms that included membrane permeability, motility and DNA fragmentation. Maximum cytotoxic activity was observed in a fraction that contained one flavonoid and cardiac glycosides. Chemical analyses of the active fractions are currently in progress to perform a better evaluation of

their biological significance. Additionally, further “in vivo” research is essential to show the full potential for the use of *T. peruviana* fruit extract in cancer therapy. In conclusion, these findings shows the importance of *T. peruviana* fruit as a source of bioactive compounds with anticancer potential.

Additional files

Additional file 1: Figure S1. Clonogenic assay of four human cancer cell lines treated with doxorubicin. Image showing colonies produced by human cancer lines and normal cell lines, following plating of 100 cells and 10–14 days incubation. Cells were treated with doxorubicin at 10 µg/mL. (PDF 1719 kb)

Additional file 2: Figure S2. Wound and healing closure activity of four human cancer cell lines treated with methanol *T. peruviana* extract. Representative photographs of wounded cancer cells monolayer after 24 h of treatment with methanol *T. peruviana* fruit extract at IC₅₀ value corresponding to each cell line. Vero and fibroblast cells were used as normal cell lines. A typical result from three independent experiments is shown. (PDF 2.74 mb)

Additional file 3: Figure S3. Wound and healing closure activity of four human cancer cell lines treated with doxorubicin. Representative photographs of wounded cancer cells monolayer after 24 h of treatment with doxorubicin at 10 µg/mL. The result from three independent experiments is shown. (PDF 2.62 mb)

Additional file 4: Figure S4. Morphological changes on four human cancer cell lines during treatment with doxorubicin. Human cancer cells were treated with doxorubicin at 10 µg/mL and monitored over a 24 h period. (PDF 1.88 mb)

Additional file 5: Figure S5. Classification of normal and cancer cell lines exposed to *T. peruviana* fruit methanolic extract according to independent component analysis (ICA). The distribution of the cell lines (panel A, projections with 95% confidence ellipses) and variables (panel B, projection of variable loadings with maximum loading indicated by a circle) is shown in the space spanned by the independent components 1 and 3. The clear unsupervised discrimination among the six cell lines reflects the greater effect of *T. peruviana* extract on tumor cell lines (lung cells, L, ?, prostate cells, P, ?, breast cells, B, ?, colorectal cells, C, ?), while normal cells are affected less (fibroblast cells, Fb, ?, Vero cells, V, ?). The independent component 1 is clearly separating cancer cells from normal cells, mainly due to the effect of the extract on the motility (WH) and membrane permeability (MP), while the independent component 3 is separating samples mainly by the anti-proliferative (clonogenic assay, CL) observed for each cell line. (PDF 1121 kb)

Abbreviations

AO: Acridine orange; ATCC: American Type Culture Collection; DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's medium; DMSO: Dimethyl sulfoxide; EB: Ethidium bromide; IC: Independent component; IC₅₀: Half maximal inhibitory concentration; ICA: Independent component analysis; MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; PBS: Phosphate buffer saline; PC: Principal component; PCA: Principal component analysis; RPMI: Roswell Park Memorial Institute medium

Acknowledgements

We are grateful to MD Nancy B. Gordon (MD Anderson Cancer Center), for kindly providing training in tissue culture techniques, as well as Dr. Mariana Elizondo Zertuche and Álvaro Colín Oviedo for their support with the fluorescence microscope (CONACYT-INFRA 2015-251142) from Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, UANL. MF thank to CONACYT for the grant INFRA 252226. We thank Yesenia Cristal García Silva for her excellent technical support and express appreciation to Dr. Angel Andrade and Dr. Geoffrey Cordell for their critical examination of the manuscript.

Funding

This research project was supported by two grants from The Program for Scientific and Technological Research (PAICYT-UANL no. CN373-15) and The National Council for Science and Technology (CONACYT, no. 239695). ASR was supported through a postgraduate scholarship (code 388785) and FTC was supported through a postdoctoral grant (code 173833) from CONACYT.

Availability of data and materials

All data and materials are contained and described in the manuscript.

Authors' contributions

ARS and FTC carried out cytotoxic activity, clonogenic, scratch motility, morphology and permeability assay, AO/EB staining, and then analyzed the data of HTB-22, HTB-38, HTB-81 and HTB-177 cells. ARG and LJGW performed cytotoxic activity, clonogenic assay, and scratch motility of CL-116 and CCL-81 cells. AGA performs the multivariate analysis. FTC and STZ drafted the manuscript. MF performed the fractionation and LC-HRMS analysis of *T. peruviana* extract and fractions. HAA conceived and designed the experiments and approval of the final draft. All authors have read and approved the final manuscript.

Competing Interests

The authors declare that they have no competing interests.

Consent for publication

Not applicable.

Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Author details

¹Instituto de Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, Avenida Universidad S/N, Ciudad Universitaria, CP 66455 San Nicolás de los Garza, NL, Mexico. ²Facultad de Química, Departamento de Farmacia, Universidad Nacional Autónoma de México, CP 04510 Ciudad de México, Mexico.

Received: 24 December 2016 Accepted: 5 April 2017

Published online: 02 May 2017

References

- World wide cancer statistics. Cancer Research UK. <http://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/worldwide-cancer>. Accessed 24 May 2017.
- Deep G, Agarwal R. Antimetastatic efficacy of silibinin: molecular mechanisms and therapeutic potential against cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2010;29:447–63.
- Liao RG, Watanabe H, Meyerson M, Hammerman PS. Targeted therapy for squamous cell lung cancer. *Lung Cancer Manag*. 2012;1:293–300.
- Zia-UI-Haq M, Riaz M, Saad B. Anthocyanins and Human Health: Biomolecular and therapeutic aspects, 1 ed. Switzerland: Springer International Publishing; 2016.
- Kinghorn AD, EJ DEB, Lucas DM, Rakotondraibe HL, Orjala J, Soejarto DD, Oberlies NH, Pearce CJ, Wani MC, Stockwell BR et al. Discovery of Anticancer Agents of Diverse Natural Origin. *Anticancer Res* 2016;36:5623–5637.
- Wen S, Chen Y, Lu Y, Wang Y, Ding L, Jiang M. Cardenolides from the Apocynaceae family and their anticancer activity. *Fitoterapia*. 2016;112:74–84.
- Alonso-Castro AJ, Villarreal ML, Salazar-Olivo LA, Gomez-Sanchez M, Dominguez F, Garcia-Carranca A. Mexican medicinal plants used for cancer treatment: pharmacological, phytochemical and ethnobotanical studies. *J Ethnopharmacol*. 2011;133:945–72.
- Oji O, Okafor QE. Toxicological studies on stem bark, leaf and seed kernel of yellow oleander (*Thevetia peruviana*). *Phytother Res*. 2000;14:133–5.
- Langford SD, Boor PJ. Oleander toxicity: an examination of human and animal toxic exposures. *Toxicology*. 1996;109:1–13.
- Bandara V, Weinstein SA, White J, Eddleston M. A review of the natural history, toxinology, diagnosis and clinical management of *Nerium oleander*

- (common oleander) and *Thevetia peruviana* (yellow oleander) poisoning. *Toxicol.* 2010;56:273–81.
11. Tian DM, Cheng HY, Jiang MM, Shen WZ, Tang JS, Yao XS. Cardiac Glycosides from the Seeds of *Thevetia peruviana*. *J Nat Prod.* 2016;79:38–50.
 12. van Meerloo J, Kaspers GJ, Cloos J. Cell sensitivity assays: the MTT assay. *Methods Mol Biol.* 2011;731:237–45.
 13. Eskandani M, Hamishehkar H, Ezzati Nazhad Dolatabadi J. Cytotoxicity and DNA damage properties of tert-butylhydroquinone (TBHQ) food additive. *Food Chem.* 2014;153:315–20.
 14. Rafahi H, Orłowski C, Georgiadis GT, Ververis K, El-Osta A, Karagiannis TC. Clonogenic assay: adherent cells. *J Vis Exp.* 2011;
 15. Collins TJ. ImageJ for microscopy. *BioTechniques.* 2007;43:25–30.
 16. Liang CC, Park AY, Guan JL. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc.* 2007;2:329–33.
 17. Strober W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Curr Protoc Immunol.* 2015;111:A3.B.1–3.
 18. Lin J, Dong HF, Oppenheim JJ, Howard OM. Effects of *astragalus radix* on the growth of different cancer cell lines. *World J Gastroenterol.* 2003;9:670–3.
 19. Cohen JJ. Apoptosis. *Immunol Today.* 1993;14:126–30.
 20. Dictionary of Natural Products. Version 25.2. <http://dnp.chemnetbase.com/>. Accessed 24 May 2017.
 21. Dray S, Dufour AB. The ade4 package: implementing the duality diagram for ecologists. *J Stat Soft.* 2007;22:1–20.
 22. Marchini JL, Heaton C, Ripley BD. fastICA: FastICA Algorithms to perform ICA and Projection Pursuit. R project. 2013. <https://CRAN.R-project.org/package=fastICA>. Accessed 24 May 2017.
 23. Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren JT, Bokesch H, Kenney S, Boyd MR. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst.* 1990;82:1107–12.
 24. Wasik AM, Almestrand S, Wang X, Hultenby K, Dackland AL, Andersson P, Kimby E, Christensson B, Sander B. WIN55,212-2 induces cytoplasmic vacuolation in apoptosis-resistant MCL cells. *Cell Death Dis.* 2011;2:e225.
 25. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007;35:495–516.
 26. Tacar O, Sriamornsak P, Dass CR. Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. *J Pharm Pharmacol.* 2013;65:157–70.
 27. Martinez M. Las plantas medicinales de Mexico, vol. 1. Librería y Ediciones Botas: Mexico; 2004.
 28. Hassan MM, Saha AK, Khan SA, Islam A, Mahabub-Uz-Zaman M, Ahmed SS. Studies on the antidiarrhoeal, antimicrobial and cytotoxic activities of ethanol-extracted leaves of yellow oleander (*Thevetia peruviana*). *Open Vet J.* 2011;1:28–31.
 29. Gata-Goncalves L, Nogueira JM, Matos O, Bruno de Sousa R. Photoactive extracts from *Thevetia peruviana* with antifungal properties against *Cladosporium cucumerinum*. *J Photochem Photobiol B.* 2003;70:51–4.
 30. Obasi IO, Nwachukwu N. Gestational iron deficiency and the related anaemia in northern zone of Ebonyi State. *Pak J Biol Sci.* 2013;16:1159–65.
 31. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011;144:646–74.
 32. Franken NA, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, van Bree C. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc.* 2006;1:2315–9.
 33. Jones SE, Dean JC, Young LA, Salmon SE. The human tumor clonogenic assay in human breast cancer. *J Clin Oncol.* 1985;3:92–7.
 34. Yarrow JC, Perlman ZE, Westwood NJ, Mitchison TJ. A high-throughput cell migration assay using scratch wound healing, a comparison of image-based readout methods. *BMC Biotechnol.* 2004;4:21.
 35. Gulhati P, Bowen KA, Liu J, Stevens PD, Rychahou PG, Chen M, Lee EY, Weiss HL, O'Connor KL, Gao T, et al. mTORC1 and mTORC2 regulate EMT, motility, and metastasis of colorectal cancer via RhoA and Rac1 signaling pathways. *Cancer Res.* 2011;71:3246–56.
 36. Fisher DE. Apoptosis in cancer therapy: crossing the threshold. *Cell.* 1994;78:539–42.
 37. Yi JM, Kim MS, Lee EH, Wi DH, Lee JK, Cho KH, Hong SH, Kim HM. Induction of apoptosis by Paljin-Hangahmdan on human leukemia cells. *J Ethnopharmacol.* 2003;88:79–83.
 38. Rahbar Saadat Y, Saeidi N, Zununi Vahed S, Barzegari A, Barar J. An update to DNA ladder assay for apoptosis detection. *Bioimpacts.* 2015;5:25–8.
 39. Zhao Q, Guo Y, Feng B, Li L, Huang C, Jiao B. Neriifolin from seeds of *Cerbera manghas* L. induces cell cycle arrest and apoptosis in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells. *Fitoterapia.* 2011;82:735–41.
 40. Srivastava V, Negi AS, Kumar JK, Gupta MM, SP. K. Plant-based anticancer molecules: a chemical and biological profile of some important leads. *Bioorg Med Chem.* 2005;13:5892–908.
 41. Boreddy SR, Srivastava SK. Pancreatic cancer chemoprevention by phytochemicals. *Cancer Lett.* 2013;334:86–94.
 42. Vijayababu MR, Arunkumar A, Kanagaraj P, Venkataraman P, Krishnamoorthy G, Arunakaran J. Quercetin downregulates matrix metalloproteinases 2 and 9 proteins expression in prostate cancer cells (PC-3). *Mol Cell Biochem.* 2006;287:109–16.
 43. Chahar MK, Sharma N, Dobhal MP, Joshi YC. Flavonoids: A versatile source of anticancer drugs. *Pharmacogn Rev.* 2011;5:1–12.
 44. Lee WR, Shen SC, Lin HY, Hou WC, Yang LL, Chen YC. Wogonin and fisetin induce apoptosis in human promyeloleukemic cells, accompanied by a decrease of reactive oxygen species, and activation of caspase 3 and Ca(2+)-dependent endonuclease. *Biochem Pharmacol.* 2002;63:225–36.
 45. Wang IK, Lin-Shiau SY, Lin JK. Induction of apoptosis by apigenin and related flavonoids through cytochrome c release and activation of caspase-9 and caspase-3 in leukaemia HL-60 cells. *Eur J Cancer.* 1999;35:1517–25.
 46. Wenzel U, Kuntz S, Brendel MD, Daniel H. Dietary flavone is a potent apoptosis inducer in human colon carcinoma cells. *Cancer Res.* 2000;60:3823–31.
 47. Josephs RD, Daireaux A, Westwood S, Wielgosz RI. Simultaneous determination of various cardiac glycosides by liquid chromatography-hybrid mass spectrometry for the purity assessment of the therapeutic monitored drug digoxin. *J Chromatogr A.* 2010;1217:4535–43.
 48. Feng Q, Leong WS, Liu L, Chan WI. Peruovoside, a Cardiac Glycoside. Induces Primitive Myeloid Leukemia Cell Death Molecules. 2016;21:534.
 49. Misra MK, Sarwat M, Bhakuni P, Tuteja R, Tuteja N. Oxidative stress and ischemic myocardial syndromes. *Med Sci Monit.* 2009;15:209–19.
 50. Nesy EA, Mathew L. Detection and Quantification of Cardiotonic Drug Peruovoside Using HPTLC from *Thevetia neriifolia*, Juss Seed Extracts. *Int J Pharm Sci Invent.* 2014;3:11–6.

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



APOCYNACEAE

UNA FAMILIA DE PLANTAS TÓXICAS

**José Alberto Ramos-Silva, Susana De la Torre-Zavala,
Hamlet Avilés-Arnaut**

Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León. San Nicolás de los Garza, NL.

La familia Apocynaceae es una familia de plantas dicotiledóneas que incluye árboles, arbustos, hierbas y lianas. La mayoría de las especies de esta familia proceden de zonas tropicales y subtropicales. Muchos de sus integrantes producen un látex lechoso, rojizo o transparente; proveniente de lactíferos constituidos por células individuales.

La familia está dividida en cinco subfamilias principales: Rauvolfioideae, 79 géneros; Apocynoideae, 82 géneros; Periplocoideae, 33 géneros; Secamonoideae, 8 géneros; Asclepiadoideae, 164 géneros.

Se distribuyen en zonas tropicales como: las selvas y zonas pantanosas de la India y Malasia (*Alstonia* y *Dyera*), en el norte de Australia (*Cerbera* y *Ochrosia*), selvas africanas (*Carissa*, *Wrightia* y *Holarrhena*), el mediterráneo (*Nerium oleander*, *Vinca major* y *Vinca minor*), Latinoamérica (*Plumeria*, *Frangipani* y *Landolphia*).

Las hojas son simples, opuestas o verticiladas, algunas presentan coléteres. Estos pueden localizarse en las axilas, en la base, sobre el pecíolo, en las bases de las brácteas y de los sépalos. Las flores son hermafroditas, actinomorfas, pentámeras, vistosas y pueden ser fasciculadas o solitarias, surgen en la parte terminal de las ramas o en las axilas de las hojas (*Mandevilla*), y cuentan con una gran variedad de inflorescencias, sobre todo racemosas; por ejemplo, umbelas (*Asclepias*), corimbos (*Cascabela*), racimos (*Mandevilla*) o panículas.

El cáliz es gamosépalo, dividido hasta su base, la corola es gamopétala, hipocraterimorfa, infundibuliforme. El limbo presenta una prefloración dextrocontorta o sinistrocontorta.

Los frutos se presentan como folículos, drupas, bayas y sámaras. Las semillas pueden ser aplanadas, ciliadas, aladas, cubiertas o desnudas.

En la antigüedad ciertas especies de la familia Apocynaceae han sido utilizadas como veneno (Woodson, 1930), como antiveneno para veneno de serpientes por algunas tribus de la india (*Nerium indicum* y *Rauvolfia serpentina*) y son ampliamente utilizadas como plantas ornamentales.

En la medicina tradicional estas especies de plantas han sido usadas para tratar diversos malestares como fiebre, malaria, dolor, diabetes, enfermedades gastrointestinales y parasitarias.

Las especies de Apocynaceae son ricas en metabolitos como triterpenoides, iridoides, alcaloides y glicósidos cardiotónicos. Estos compuestos poseen una gran cantidad de actividades biológicas y farmacológicas como cardioprotectores, hepatoprotectores, neuroprotectores, hipoglicemiantes y antiinflamatorios (Omino et al., 1993).

Diversas especies de la familia Apocynaceae han sido reportadas por tener una fuerte actividad citotóxica, por lo que poseen una importante actividad anticáncer (Chan et al., 2016). Algunas de estas especies son *Allamanda cathartica*, *Alstonia angustiloba*, *Calotropis gigantea*, *Catharanthus roseus*, *Cerbera odollam*, *Nerium oleander*, *Plumeria obtusa* y *Thevetia peruviana*.



Figura 1. *Allamanda cathartica*



Figura 2. *Alstonia angustiloba*.

Allamanda cathartica (Figura 1), son arbustos robustos que pueden crecer hasta 6 m de alto. Tienen flores amarillas con forma de trompeta, hojas elípticas. Los frutos son encapsulados con espinas. Las hojas de *A. cathartica* son usadas en la medicina tradicional como tratamiento para la malaria, purgativo y emético (Rahayu et al., 2001).v



Figura 3. *Calotropis gigantea*.

Estudios sobre el extracto acuoso de *A. cathartica* demostraron que posee propiedades antileucémicas gracias a una lactona iridoide aislada del extracto conocida como alamadina (Kupchan et al., 1974).

Alstonia angustiloba (Figura 2), es un árbol de tamaño medio que puede crecer hasta 45 m de alto. Tiene un tronco alto y recto de 1 m de diámetro. Al ser cortado el tronco produce un látex lechoso. Las hojas son elípticas y rizadas. Las hojas de *A. angustiloba* son aplicadas externamente para tratar fiebre y dolores de cabeza (Teo et al., 2001), y el látex es usado para tratar abscesos e hinchazones en la piel (Mulyoutami, 2009).

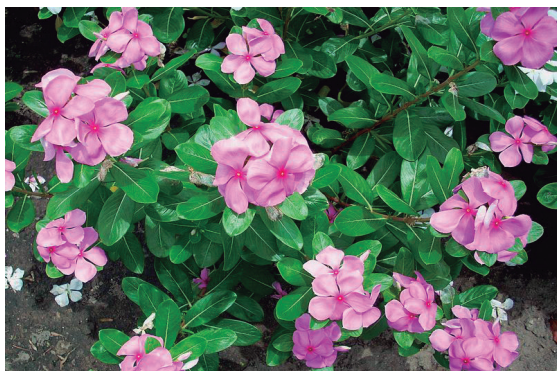


Figura 4. *Catharanthus roseus*.



Figura 5. *Cerbera odollam*.



Figura 6. *Nerium oleander*.



Figura 8. *Thevetia peruviana*.

En un estudio se aislaron del extracto metanólico cinco alcaloides (Astilobaninas A-E) que tienen actividad vasodilatante (Koyama et al., 2008). Los extractos de las hojas han demostrado poseer actividad anticáncer con CI50 (Concentración Inhibitoria media) reportadas de 20 ± 1.7 , 20 ± 1.1 y 16 ± 1.4 $\mu\text{g/ml}$ para las líneas MDA-MB-231, HeLa y HT-29 respectivamente (Wong et al., 2011).

Calotropis gigantea (Figura 3), es un pequeño árbol con 3 a 4 metros de alto. Las hojas son ovaladas con venas ligeramente coloreadas. Las hojas son de un lila pálido. Es una especie de rápido crecimiento y florece durante todo el año. Posee una alta variedad de usos en la medicina tradicional. Las raíces se usan como antídoto para mordeduras de víboras (Kitagawa et al., 1992). Las hojas y raíz se usan para tratar tumores abdominales, sífilis, lepra, enfermedades de la piel, reumas, úlceras y elefantitis (Agrawal et al., 2010).

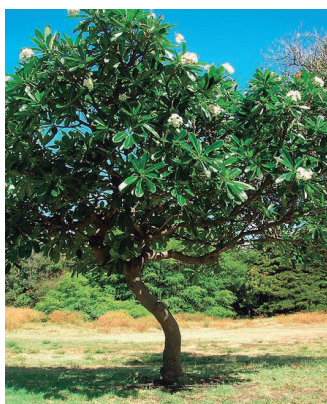


Figura 7. *Plumeria obtusa*.

La constitución química de *C. gigantea* se ha estudiado extensivamente lo que ha llevado al aislamiento de diversos cardenólidos, flavonoides, terpenos, y pregnanos (Linhatrakool et al., 2006). Tres glicósidos cardiotónicos (calotropina, frugosida y 4'-O- β -D-glucopiranosil frugosida) aislados de la raíz de *C. gigantea* mostraron tener actividad citotóxica sobre las células de cáncer KB, MCF-7 y NCI-H187 (Seeka et al., 2010). Del extracto etanólico se aisló la coroglaucigenina, que exhibió una potente actividad contra las líneas K-562 y SGC-7901.

Catharanthus roseus (Figura 4), es una hierba perenne que crece hasta 1 metro de alto. Las hojas pueden ser ovaladas o elípticas con un ápice redondeado. Las flores tienen forma de trompeta y pueden ser de colores púrpuras, rojas, rosas o blancas. La fruta consiste en dos folículos cilíndricos que producen muchas semillas negras diminutas. Florecen durante todo el año y puede ser propagada tanto por semillas, como por partición (esquejes). Históricamente, se ha usado para tratar una amplia variedad de enfermedades (Aslam et al., 2010). Decocciones de la planta entera son usadas para el tratamiento de malaria, diarrea, diabetes, enfermedades de la piel y cáncer.

Extractos preparados de las hojas son usados como agentes antisépticos para la curación de heridas. Existen drogas comerciales que se han desarrollado a partir de los alcaloides aislados de *C. roseus* (vinblastina y vincristina) (Aslam et al., 2010). El sulfato de vinblastina (Velban) es usada para el tratamiento de la enfermedad de Hodgkin. El sulfato de vincristina (Onco-vin) es efectivo para el tratamiento de leucemia aguda y leucemia linfocítica.

Cerbera odollam (Figura 5), son pequeños árboles de 30 metros de alto. El tronco exuda de manera abundante un látex blanco. Las hojas están ordenadas en espiral y agrupadas en los ápices de las ramas. Las flores son blancas con un centro rosa. Las frutas son drupas con una sola semilla. Las hojas, corteza, látex y semillas son usadas como eméticos y purgativos. Además de contar con actividad anticáncer documentada, el extracto metanólico de las hojas de *C. odollam* tiene una fuerte actividad inhibidora contra las líneas MCF-7 y T47D con CI50 de 8.5 y 11 µg/ml respectivamente (Nurhanan et al., 2008). Se ha aislado un nuevo glicósido cardiotónico y tres compuestos conocidos (neriifolin 17α, neriifolin 17β y cerberina) de las semillas y raíz que fueron efectivos contra las líneas KB, BC y NCI-H187 (Cheenpracha et al., 2004).

Nerium oleander (Figura 6), son arbustos o pequeños árboles que miden de 2-6 metros de altura. Las hojas son en pares o grupos de tres, anchas y de una coloración verde oscuro.

Las flores nacen en grupos al final de cada rama, su color varía de blanco, rosa, rojo y amarillo y tienen un diámetro de 2.5 a 5 cm. Tienen un aroma dulce. El fruto es una cápsula larga y angosta que se parte al alcanzar la madurez y libera numerosas semillas. Son ampliamente usadas como plantas de ornato.

N. oleander es altamente venenosa y contiene compuestos tóxicos como oleandrina y neriina. El extracto de *N. oleander*, Anvitzel, es promovido para el tratamiento de cáncer, SIDA y enfermedades cardíacas (Pathak et al., 2000). Se han reportado diversos compuestos en la composición del extracto de *N. oleander* (Sharma et al., 2010). Los principales componentes incluyen: triterpenoides, pregnanos y cardenólidos. Extractos de las hojas y tallo han demostrado poseer una actividad citotóxica contra las líneas celulares de K-562, HL60, MCF-7, MDA-MB-231, HeLa, HT-29 y SKOV-3 (Wong et al., 2011). Los triterpenos y cardenólidos aislados mostraron una mayor inhibición contra la línea celular MCF-7 con CI50 de 3.7 y 4.3 µg/ml respectivamente.

Plumeria obtusa (Figura 7), son árboles que crecen hasta 5 metros de altura. Los tallos producen una savia lechosa. Las hojas son ovaladas de un color verde oscuro, ordenadas en espiral, y agrupadas en la punta de los tallos. Las flores son blancas con forma de embudo de 4 cm de diámetro, con el interior de un color levemente amarillo. Florecen durante todo el año. La decocción de las hojas es usada para el tratamiento de heridas y enfermedades de la piel. La savia extraída del tronco es usada como diurético. Se han identificado triterpenoides como componentes principales de las hojas de *P. obtusa* (Siddiqui et al., 1994).

El extracto metanólico de la corteza es efectivo contra úlceras gástricas y el extracto hexanólico de las hojas tiene actividad anticáncer sobre las líneas MCF-7 y HeLa con CI50 de 5.7 y 10 µg/ml respectivamente (Wong et al., 2011).

Thevetia peruviana (Figura 8), es un árbol que crece de 3 a 8 metros de altura. Posee hojas lineales de ápice agudo con base cuneado-atenuada, de un color verde vivaz y están recubiertas por una cera para reducir la pérdida de agua. Florece durante el verano y otoño. Las flores son de color amarillo con forma de embudo. Los frutos son drupas carnosas redondeadas y con costillas; al madurar cambian del verde al negro, pasando por el rojo. Son potencialmente tóxicas y se utilizan desde hace ya cientos de años en la medicina china tradicional. Se cree que tiene propiedades curativas para quemar grasa, reducir triglicéridos y colesterol. Los extractos de *T. peruviana* han mostrado poseer una fuerte actividad citotóxica en líneas de cáncer humano como Du145, MCF-7, HT-29 y H460 con CI50 de 1.91, 5.78, 6.3 y 12.04 µg/ml respectivamente; y no presentar efecto sobre líneas normales como Detroit 548 (Ramos-Silva et al., 2017). Se ha reportado la presencia de glicósidos cardiotónicos en el fruto y semillas de *T. peruviana*, que se cree son responsables de su actividad antitumoral.

Conclusiones

En conclusión, la familia Apocynaceae poseen una amplia variedad de propiedades farmacológicas destacando principalmente su actividad antiproliferativa en contra de células de cáncer humanas. Esta actividad es debida a la presencia de compuestos tales como: alcaloides, cardenólidos, triterpe-noides, iridoides, pregnanas y flavonoides. Sin embargo, aún no se conoce la fitoquímica de muchas especies de esta familia que podrían contener compuestos nuevos con actividades farmacológicas importantes.

Referencias

- Agrawal, V. K., Ganesh, N., & Chundattu, S. J. (2010). Isolation of isorhamnetin-3-O- α -rhamnopyranosyl- β -gluco-pyranoside from *Calotropis gigantea*. *Natural Product Medicine*, 3, 84–6.
- Aslam, J., Khan, S. H., Siddiqui, Z. H., Fatima, Z., Maqsood, M., Bhat, M. A., et al., (2010). *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. An important drug: its applications and production. *International Journal of Comparative Pharmacology*, 4, 1–16.
- Chan, E. W. C., Won, S. K., & Chan, H. T. (2016). Apocynaceae species with antiproliferative and/or antiparasitic properties: a review of ten genera. *Journal of Integrative Medicine*, 14(4), 269–284.
- Cheerpracha, S., Karalai, C., Rat-A-Pa, Y., Ponglimanont, C., & Chantapromma, K. (2004). New cytotoxic cardenolide glycoside from the seeds of *Cerbera manghas*. *Chemical Pharmacology Bulletin*, 52(8), 1023–25.
- Kitagawa, I., Zhang, R., Park, J. D., Baek, N. I., Takeda, Y., Yoshikawa, M., et al., (1992). Indonesian medicinal plants. I. Chemical structures of calotroposides A and B, two new oxypregnane-oligoglycosides from the root of *Calotropis gigantea* (Asclepiadaceae). *Chemical Pharmacology Bulletin (Tokyo)*, 40, 2007–13.
- Koyama, K., Hirasawa, Y., Zaima, K., The, C. H., Chan, K. L., & Morita, H. (2008). Alstilobanines A-E, new indole alkaloids from *Alstonia angustiloba*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 16, 6483–8.
- Kupchan, S. M., Dessertine, A. L., Blaylock, B. T., & Bryan R. F. (1974). Isolation and structural elucidation of allamandin, and antileukemic iridoid lactone from *Allamanda cathartica*. *Journal of Organic Chemistry*, 39, 2477–82.
- Linhatrakool, T., & Sutthivaiyakit, S. 19-Nor and 18,20-epoxy-cardenolides from the leaves of *Calotropis gigantea*. *J Nat Prod* 2006; 69:1249–51.
- Mulyoutami, E., Rismawan, R., & Joshi, L. (2009). Local knowledge and management of sim-pukng (forest gardens) among the Dayak people in East Kalimantan, Indonesia. *Forest Ecology and Management*, 257, 2054–61.
- Nurhanan, M. Y., Asiah, O., Mohd Ilham, M. A., Siti Syarifah, M.M., Norhayati, I., & Lili Sahira, H. (2008). Anti-proliferative activities of 32 Malaysian plant species in breast cancer cell lines. *Journal of Tropical Forest Science*, 20, 77–81.
- Omino, E. A., Kokwaro, J. O. (1993). Ethnobotany of Apocynaceae species in Kenya. *Journal of Ethnopharmacology*, 40, 167–80.
- Pathak, S., Multani, A. S., Narayan, S., Kumar, V., & Newman, R. A. (2000) Anvirzel™, an extract of *Nerium oleander*, induces cell death in human but not murine cancer cells. *Anticancer Drugs*, 11, 455–63.
- Rahayu, S. S. B., & Allamanda, L. (2001). Medicinal and Poisonous Plants 2. In: Valkenburg, J. L. CH., & Bunyapraphatsara, N. (Editors). *Plant Resources of South-East Asia*, No. 12(2), Backhuys Publisher. Leiden, Netherlands.
- Ramos-Silva, A., Tavares-Carreón, F., Figueroa, M., De la Torre-Zavala, S., Gastelum-Arellanez, A., Rodríguez-García, & Avilés-Arnaut, H. (2017). Anticancer potential of *Thevetia peruviana* fruit methanolic extract. *Complementary and Alternative Medicine*, 17(1), 241.
- Seeka, C., & Sutthivaiyakit, S. (2010). Cytotoxic cardenolides from the leaves of *Calotropis gigantea*. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, 58, 725–8.
- Sharma, P., Choudhary, A. S., Parashar, P., Sharma, M. C., & Dobhal, M. P. (2010). Chemical constituents of plants from the genus *Nerium*. *Chemical Biodiversity*, 7, 1198–207.
- Siddiqui, B. S., Naeed, A., Begum, S., & Siddiqui, S. (1994). Minor iridoids from the leaves of *Plumeria obtusa*. *Phytochemistry*, 37, 769–71.
- Teo, S.P., & Alstonia, R. Br. (2001). In: van Valkenburg, J. L. CH., & Bunyapraphatsara, N. (Editors). *Plant Resources of South-East Asia*. No. 12(2). Backhuys Publisher. Leiden, Netherlands.
- Wong, S. K., Lim, Y. Y., Abdullah, N. R., & Nordin, F. J. (2011). Antioxidant, antiproliferative and antiparasitic activities of leaves of selected Apocynaceae species. *BMC Complementary Alternative Medicine*, 11, 3.
- Wong, S. K., Lim, Y. Y., Abdullah, N. R., & Nordin, F. J. (2011). Antiproliferative and phytochemical analyses of leaf extracts of ten Apocynaceae species. *Pharmacognosy Research*, 3, 100–6.
- Woodson, R. E. (1930). Studies in the Apocynaceae I (a critical study of the Apocynoidea, with special reference to genus *Apocynum*). *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 17, 1–83.